

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHARAKTERISIERUNG
AUSTAUSCHBARER KALZIUMFRAKTIONEN
DER GLATTEN MUSKULATUR
(*Taenia coli* des Meerschweinchens)
BEI ANWENDUNG DER LANTHANUMMETHODE

Josef W. Ölscher

1901

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Prof. Dr. E. Gerlach

Prof. Dr. K. Thirau

Untersuchungen zur Charakterisierung austauschbarer

Kalziumfraktionen der glatten Muskulatur

(Taenia coli des Meerschweinchens)

bei Anwendung der Lanthanummethode

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Josef W. Ölscher

aus

Gröbenzell

Jahr

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. C. J. Mayer
Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. ten Bruggencate
Dekan : Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung : 5. Mai 1981



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Methodik	9
3. Ergebnisse	12
3.1 Austauschbare Kalziumfraktion	12
3.1.1 Abhängigkeit von $[Ca]_e$	12
3.1.2 Verhältnis von $[Ca]_i : [Ca]_e$	12
3.1.3 Sorbitraumbestimmung bei Anwendung der Lanthanum- methode (Rest-ECR)	14
3.2 Transmembranaler Kalziumtransport	20
3.2.1 Erhöhung der $[Ca]_i$ in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration	20
3.2.2 Wirkung von Pharmaka, die die Spontanaktivität unterdrücken	21
3.2.3 Wirkung von Pharmaka, die als ATPase-Hemmstoffe gelten	22
3.2.4 Beeinflussung der mechanischen Aktivität durch ATPase- Hemmstoffe	24
4. Diskussion	28
4.1 Zur Methodik	28
4.1.1 Anwendungsbereich der Lanthanummethode	28
4.1.2 Nachteil der Lanthanummethode	28
4.1.3 Mögliche Fehler bei Verwendung von Sorbit zur ECR-Be- stimmung	31
4.2 Austauschbare Kalziumfraktion	32
4.3 Beeinflussung des transmembranalen Kalziumtransportes	34
4.4 Koppelung von Erregung und Kontraktion	37
5. Zusammenfassung	39
6. Literaturverzeichnis	41
7. Lebenslauf	51
8. Danksagung	52

Abkürzungen

AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
$[Ca]_e$	extrazelluläre Kalziumkonzentration
$[Ca]_i$	intrazelluläre Kalziumkonzentration
ECR	Extrazellulärraum
FG	Feuchtgewicht
ICR	Intrazellulärraum
SA	Spontanaktivität
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

1. Einleitung

Die Kalziumabhängigkeit der Elementarkontraktion wurde bisher vor allem für die Herz- und Skelettmuskulatur nachgewiesen (55, 118) aber auch für verschiedene glattmuskuläre Gewebe angenommen (17, 49, 96).

Eine Gewebskonzentration von 10^{-5} mol/l Kalzium führt zur Aktivierung des kontraktile Systems (55, 59, 77, 136, 152), während eine solche von 10^{-7} mol/l Kalzium völlige Erschlaffung bedeutet (55, 87). Eine Korrelation zwischen halbmaximaler mechanischer Antwort und einer entsprechenden Myosin-ATPase-Aktivität findet sich am glatten (17) ebenso wie am quergestreiften Muskel (56) bei einer Kalziumkonzentration von 10^{-6} mol/l.

Neben einem ausgeprägten intrazellulären Speichersystem in Form des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) besitzt die quergestreifte Muskulatur transversale tubuläre Systeme, die die Erregung der Muskelmembran in die Tiefe der bis zu 100 um dicken Skelettmuskelfaser leiten. Der Mechanismus der Kalziumfreisetzung ist noch nicht völlig aufgeklärt, es scheinen jedoch während des Aktionspotentials (AP) geringste Mengen Kalzium durch die Membran in die Zelle zu strömen. Diese müßten, da sie selbst nicht in der Lage sind, das kontraktile System zu aktivieren, die Freisetzung von weiteren intrazellulär gespeicherten Kalziumionen auslösen (Trigger Theorie : 63, 64). Trautwein et al (164) postulierten am Herzmuskel eine Membranpotentialänderung mit gleichzeitiger Erhöhung der Kalziumleitfähigkeit. Bei dieser Depolarisations-Theorie würden die zur Kontraktion nötigen Kalziumionen ebenfalls auf dem Weg über die terminalen Cysternen den myoplasmatischen Raum erreichen. Wegen der kurzen Diffusionsstrecken zwischen terminalen Cysternen und longitudinalem tubulären Apparat kann bei Beendigung der Kontraktion das im myoplasmatischen Raum vorhandene Kalzium rasch unter ATP Verbrauch wieder herausgepumpt werden. Eine schnelle Erschlaffung des quergestreiften Muskels ist aus diesem Grunde möglich.

Ein derart gestaltetes T-System fehlt am glatten Muskel völlig. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten intrazelluläre, kalziumakkumulierende Strukturen an Mitochondrien (53, 157) und mikrosomalen Zellfraktionen (6, 93)

gefunden werden. Neben dem, wenn auch spärlich entwickelten SR erhalten die als Caveolae bezeichneten Membraneinstülpungen (52, 69, 123, 142, 179) größere Bedeutung. Am SR ist ein aktiver Kalziumtransport möglich (53, 60, 93). Verschiedene glattmuskuläre Organe haben unterschiedliche Mengen kalziumspeichernder bzw. -transportierender Strukturen.

Tonisch aktive Muskelzellen (z.B. Arterien) zeigen mit 5 % des Zellvolumens den größten Anteil an SR, während phasisch aktive Muskeln(z.B. Portalvenen und Taenia coli) einen Anteil von 2 % besitzen (53). Dieselben Autoren zeigten auch, daß Kontraktionen SR-reicher Muskelgewebe in kalziumfreien Lösungen über einen längeren Zeitraum erhalten bleiben. Unterschiedliche Kalziumspeicherkapazitäten wurden auch für die Intestinalmuskulatur verschiedener Spezies gefunden (83). Die aufgeführten Befunde deuten die Vielfalt der Kalziumspeicherung und -bewegung im glattmuskulären Gewebe an. Diese erschwert Übertragungen von Versuchsergebnissen verschiedener Gewebe und erlaubt nur bedingt analoge Rückschlüsse.

Am Skelettmuskel fungiert ein schneller Natriumeinstrom als Träger des AP. Elektrophysiologische Untersuchungen an der glatten Muskulatur zeigten jedoch, daß hier ein anderer Erregungsmechanismus zugrunde liegen muß (19, 31). Die Autoren waren der Ansicht, daß das AP des glatten Muskels in hohem Maße von der Kalziumkonzentration der extrazellulären Flüssigkeit abhängig sei und durch eine Änderung der extrazellulären Natriumkonzentration kaum beeinflusst wird. Als Beweis für ein kalziumgetragenes Aktionspotential dienten Versuche mit Tetrodotoxin, einem spezifischen Hemmstoff für den schnellen Natriumeinstrom während der Initialphase des AP der Skelettmuskelfaser und am Nervengewebe. Am glatten Muskel zeigt es jedoch keinerlei Wirkung auf das AP (99, 115, 135, 139). Eine Vergrößerung der Anstiegssteilheit des AP der glatten Muskulatur läßt sich durch Erhöhung der $[Ca]_e$ erzielen (115). Auch werden zur Unterstützung dieser These Versuche an Barnacle-Muskelfasern herangezogen, bei denen zweiwertige Ionen -insbesondere Ba^{++} - Kalziumionen ersetzen können, so daß die Membranen weiterhin erregbar bleiben (85).

Andere Untersuchungen gingen davon aus, daß der ionale Einwärtsstrom während der Erregung ausschließlich von Kalzium getragen sein könnte. Unter dieser Annahme kann die zur vollen Aktivierung nötige Kalziummenge von 10 bis 25 $\mu\text{mol/kg}$

FG (77) im Laufe von 5 - 10 Aktionspotentialen in die Zellen strömen. Wegen der kurzen Diffusionsstrecken von der Membran bis zur Zellmitte bzw. den kontraktilen Proteinen - der Durchmesser glatter Muskelzellen beträgt zwischen 2 und $10\mu\text{m}$ (36), bei der *Taenia coli* zwischen 2 und $6\mu\text{m}$ (144, 178) - erscheint eine ausreichend schnelle Aktivierungszeit durch Kalziumdiffusion aus dem Extrazellulär-raum (ECR) durchaus möglich zu sein (78). Elektrophysiologisch konnte ein ausschließlich durch Kalzium getragenes Aktionspotential jedoch nie bewiesen werden. Außer an Myometriumzellen des graviden Uterus (100, 132) welche die größten der glatten Muskelzellen darstellen - nach Csapo (48) $10\mu\text{m} \times 600\mu\text{m}$ - scheiterte die zellgrößenabhängige Voltage-Clamp-Methode an anderen kleineren Gewebszellen (12, 35, 112, 169).

Der während der Erregung auftretende Kalziumeinwärtsstrom kann auch durch Messung des transmembranalen Kalziumaustausches mit Hilfe von radioaktivem Kalzium bestimmt werden (11, 75, 76, 77, 116, 117, 126, 166). Keiner der Untersucher konnte eindeutige Erhöhungen der intrazellulär aufgenommenen Kalziummengen bei spontanaktiven gegenüber inaktiven, erschlafften Muskeln messen. Ein wesentliches Problem, auf diese Art signifikante Werte zu erhalten, liegt in den großen freien und gebundenen extrazellulären Kalziummengen (41) gegenüber den geringen möglichen intrazellulären Kalziumverschiebungen der spontanaktiven Muskulatur.

Eine Unterdrückung der Spontanaktivität kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Adrenalin und verwandte Substanzen verursachen durch β -Stimulation eine erhöhte Gewebsaufnahme von Kalzium, die mit einer gleichzeitigen Sequestrierung und Membranpermeabilitätsänderung einhergeht (3, 32, 129). Bei Unterkühlung zeigt der glatte Muskel nur oberhalb 30°C Spontanaktivität, die Membran bleibt jedoch noch bei 13°C erregbar und elektrisch reizbar (116, 124). Im Gegensatz zur ungereizten Muskulatur war aber in keinem Versuch eine signifikante Mehraufnahme von Kalzium bei elektrischer Stimulation nachweisbar. Am besten kann die Spontanaktivität der Taenien durch Verapamil bzw. dessen Methoxyderivat D 600 unterdrückt werden. Dieser kompetitive Kalzium-Antagonist (61, 62, 149) hat auch keinen Einfluß auf das Membranpotential.

Angesichts der relativ großen extrazellulären austauschbaren Kalziummengen bot

sich die Lanthanum-Methode an, um die kleinen intrazellulär zu erwartenden Kalziumverschiebungen an spontan aktiver Muskulatur zu messen. 1969 von van Breemen konzipiert (20) wurde sie später von v. Breemen und Mitarbeitern weiterentwickelt (22, 24, 25, 26, 27). Die Autoren legten die Hypothese von Lettvin et al (121) zugrunde, daß Kalziumionen durch ähnlich aufgebaute Ionen an ihren Bindungspositionen ersetzt oder aus diesen verdrängt werden können. La^{3+} , das bei gleichem Radius des hydratisierten Ions eine größere Ladungsdichte als Ca^{++} hat, sollte daher eine größere Affinität als Kalzium zu den vorhandenen Bindungsstellen haben. V. Breemen und Mitarbeiter folgerten daraus, daß das so verdrängte Kalzium nun frei im ECR vorhanden sein muß und in kalziumfreier Lösung leicht ausgewaschen werden kann. Für den transmembranalen Ionenfluß an künstlichen Phospholipid-Cholesterol-Membranen besteht ein Affinitätsoptimum für negative Transportbindungsstellen (29). Werden statt Ca^{++} - teilweise La^{3+} - Ionen verwendet, so wird zuerst der transmembranale Kalziumfluß verlangsamt und kommt nach vollständigem Besetzen der Bindungsstellen durch Lanthanum zum Erliegen. Dieser Sachverhalt wurde auch an lebenden Membranen (mit markiertem Kalzium perfundierte Tintenfischaxone) nachgewiesen (27). Trotzdem war auch bei völliger Blockierung durch Lanthanum ein kleiner Restfluß von Kalzium durch die Membran zu beobachten. Dieser kann dadurch bedingt gewesen sein, daß entweder Lanthanum am lebenden Gewebe nicht alle Bindungsstellen erreichen und blockieren kann oder andere Mechanismen am Kalziumtransport beteiligt sind, die von Lanthanum nicht beeinflusst werden können. Lanthanum erniedrigt nicht nur den gesamten Kalziumgehalt des Gewebes sondern blockiert auch ausreichend den transmembranalen Kalziumaustausch, so daß eine intrazelluläre Kalziumfraktion gemessen werden kann (37, 42, 130).

Mit dieser Methode konnte erstmals auch die Kalziumaufnahme an Aortenmuskelpräparaten des Kaninchens mit der beobachteten mechanischen Aktivität korreliert werden (24).

Schwierigkeiten bereitete die eindeutige Bestimmung der intrazellulären Kalziummenge, die möglicherweise an der Kontraktion beteiligt ist. Die graphische Auswertung einer Reihe von Auswaschversuchen (130) zeigte erst nach 60 Minuten einen in Abhängigkeit von der Zeit linearen Abfall des im Gewebe verbleibenden Kalziums. Dies deutet darauf hin, daß ab diesem Zeitpunkt ein einheitliches Komparti-

ment entleert wird. Durch Extrapolation auf Null kann die ursprünglich in diesem Kompartiment vorhandene Kalziummenge berechnet werden. Dieser Menge entsprechende Werte finden sich in den Auswaschkurven bei ca. 45 Minuten Auswaschzeit.

Für unsere Versuche schien diese Lanthanummethode geeignet, um bei schonender Behandlung der Gewebe kleinste Kalziumverschiebungen messen zu können. Mayer et al (130) haben mit Hilfe dieser Methode an spontan aktiven Muskelzellen der *Taenia coli* eine geringe austauschbare Kalziumfraktion messen können. Beim Vergleich mit Geweben, deren Spontanaktivität durch 2×10^{-5} mol/l D 600 blockiert war, ergab sich bei spontanaktiven Taenien nach 3 Stunden eine Mehraufnahme von $28 \mu\text{mol/kg FG}$.

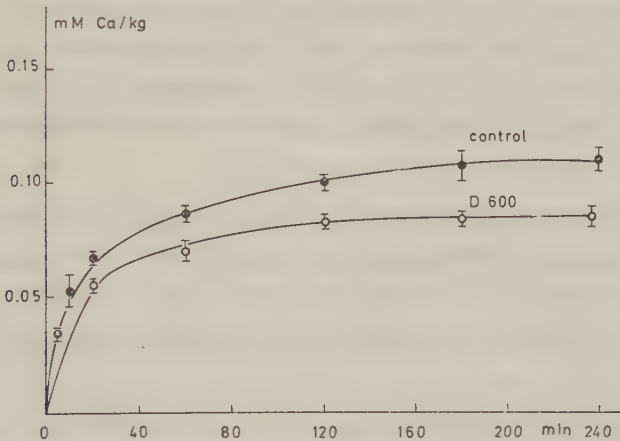


Abb. 1: "Intrazellulär" austauschbare Kalziumfraktion an glatten Muskelzellen der *Taenia coli*, bestimmt mit der Lanthanummethode. Ausgetauschte Kalziumfraktion bei spontanaktiven (●) und mit 2×10^{-5} mol/l D 600 inaktivierten Taenien (○) in Abhängigkeit von der Aufladezeit in 45-Kalziumlösung. Aus C. J. Mayer et al (1972)

Diese Kalziummenge ergäbe bei einer angenommenen AP Frequenz von 1/sek. einen im Nanomolbereich liegenden Kalziumeinstrom pro Aktionspotential, wodurch das kontraktile System nicht annähernd aktiviert werden könnte.

Mayer et al (130) diskutierten zwei Erklärungsmöglichkeiten:

- 1) Die eingeströmten Kalziummengen werden durch eine leistungsfähige Pumpe

wieder herausgeschafft.

2) Es existiert ein intrazelluläres Kalziumspeichersystem, welches mit dem extrazellulärem Raum in ca. 80 Minuten austauschbar ist (Erreichen eines Plateaus).

Ad. 1) Ionale Koppelungsmechanismen, die Kalzium entgegen seinem Konzentrationsgradienten aus der Zelle herauspumpen, sind bekannt. In Analogie zu Versuchen, an Tintenfischaxonen (8) und Barnackelmuskelfasern (153) wurde für verschiedene glattmuskuläre Gewebe eine Natrium-Kalzium Kopplung postuliert (14, 15, 103, 113, 147, 160) die für die *Taenia coli* jedoch nicht bestätigt werden konnte (24, 41, 44, 145).

Die zuletzt zitierten Autoren fanden in erster Linie Hinweise für eine metabolisch abhängige, kalziumaktivierte ATPase, die in der Membran lokalisiert sein könnte. Diese Vermutung wurde durch Versuche unterstützt, in denen für verschiedene Gewebe gezeigt wurde, daß Kalzium-ATPasen in der Lage sind, Kalziumionen entgegen dem elektrochemischen Gradienten durch die Membran zu pumpen, so z.B. an Mitochondrien der Rattenleber (133, 168), am SR (167), isolierten Sarkolemm (127) und an roten Blutkörperchenmembranen (154, 170).

Auch für die *Taenia coli* wurde ein solches ATP getriebenes Pumpsystem postuliert, das einem sehr kleinen passiven Kalziumeinstrom entgegen wirkt (24). Durch längere Einwirkung von DNP-IAA-Lösungen kann sowohl dieser Influx vergrößert werden, als auch der zelluläre Efflux in Gegenwart von EGTA gesteigert werden (28, 41, 145).

Mit Hilfe von Kalzium-Efflux-Experimenten sollte das austauschbare Kalziumkompartiment näher charakterisiert werden (28). Vergleiche des zellulären ATP-Gehaltes (während metabolischer Hemmung) mit der entsprechenden Kalziumauswaschkurve zeigen eine positive Korrelation zwischen ATP-Abfall und dem Zeitverlauf der Kalziumeffluxraten. Sogar eine 15-fache Änderung der Kalziumkonzentration in der Badelösung kann die Form der Auswaschkurven vor und nach metabolischer Hemmung kaum beeinflussen. Statt der möglichen Kalziumaustauschdiffusion wurde deshalb von den Autoren der aktive Auswärtstransport als die wahrscheinlichere Möglichkeit bezeichnet. Zum selben Ergebnis kamen auch Casteels und van Breemen (41).

Ad. 2) Im Gegensatz zum bisher Gesagten wäre ein Einstrom extrazellulären Kalziums nur in geringem Maße erforderlich, wenn die austauschbare intrazellulär gespeicherte Kalziummenge von $80 \mu\text{mol/kg}$ FG beim Kontraktionsvorgang zur Verfügung stünde. Das zur Kalziumaktivierung führende AP könnte dann neben Ca^{++} - auch von Na^{+} -Ionen getragen sein, wie bereits an der Froschvorhofmuskulatur (151), sympathischen Ganglienzellen des Ochsenfrosches (111), verschiedenen Herzmuskelzellen (105, 108, 109, 110, 165) und an der Uterusmuskulatur (1, 100) gezeigt wurde. Spezifische Natriumkanäle wie am Herzmuskel (108) und in der quergestreiften Muskulatur scheinen an der glatten Muskulatur höchst unspezifisch ausgebildet zu sein (121) und können während des AP neben Na^{+} - auch von Sr^{++} und Ba^{++} -Ionen (3) passiert werden.

Da die Membran der glatten Muskelzelle eine extrem niedrige Kalziumpermeabilität besitzt und auch während des AP nur wenig Ca^{++} -Ionen in die Zelle gelangen (130, 156), wurde die für die Skelett- (57, 64, 140) und Herzmuskulatur (58, 106) aufgestellte Trigger-Theorie von Somlyo (in Diskussion zu 53) in Erwägung gezogen.

Unter dieser Annahme müßte der größte Teil des Aktionsstromes von Natrium getragen werden, was bisher nur für Myometriumzellen gezeigt werden konnte (1, 100, 131).

Würde unter "Ruhebedingungen", das heißt bei Taenien, die mit D 600 inaktiviert wurden, die austauschbare Kalziummenge von $60\text{-}80 \mu\text{mol/kg}$ FG frei und ionisiert im Intrazellulärraum (ICR) vorliegen, müßte eine Dauerkontraktur zu beobachten sein. Dies ist aber nicht der Fall, auch wenn die Taenien in Gegenwart von D 600 zusätzlich mit $154 \text{ mmol/l } \text{K}^{+}$ in der Badelösung depolarisiert werden (130). Ebenso zeigt die Ileummuskulatur des Meerschweinchens keine wesentliche Spannungszunahme, obwohl sie in $36 \text{ mmol/l } \text{Ca}^{++}$ haltiger Badelösung eine große Kalziummenge aufnimmt (94).

Die Autoren vermuteten deshalb eine extra- (stabilisierende) und intrazelluläre (speichernde) Bindung für Kalzium. Eine weitere Charakterisierung derartiger Bindungsstellen gelang nur insoweit, als ein schnell austauschbares Kompartiment mit 63 % des aufgenommenen Kalziums im ECR nachgewiesen werden konnte (117).

Die restlichen 37 % (vermutlich intrazellulär oder membrangebunden) wurden nicht näher beschrieben.

Bessere Aufschlüsse über die intrazelluläre Kalziumspeicherung konnten von elektronenmikroskopischen, ultrahistochemischen und autoradiographischen Untersuchungen der glatten Muskelzellen erwartet werden. Auf diese Art wurden u. a. mikrosomale und membrannahe Kalziumspeicher in glatten Muskelzellen der Schweinekoronararterie nachgewiesen (179).

Wegen seiner unmittelbaren Nachbarschaft zu den intrazellulären Kalziumspeichern (Mitochondrien, zytoplasmatische Vesikel) einerseits und den mit dem ECR in Verbindung stehenden Caveolae andererseits betrachtete Gabella in seinen Versuchen (66, 67, 68, 69) das SR als einen wichtigen Faktor für Kalziumspeicherung und -transport im glatten Muskel. In weiteren Untersuchungen wurden die intrazellulären Kalziumspeicher noch genauer beschrieben (53, 97, 123, 180) und auch die Unterschiede zwischen einzelnen Gewebearten wie z.B. Arterien und Ileummuskulatur aufgezeigt.

Wegen der bereits erwähnten geringfügigen Kalziumpermeabilität scheinen die Caveolae eine wesentliche Bedeutung im transmembranalen Kalziumaustausch zu besitzen. Sie können an der Taenia coli die Membranoberfläche bis zu 70 % erhöhen (78) und ca. 10-15 % des ECR Volumens betragen (122).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, bei Anwendung der Lanthanum Methode

- a) das austauschbare Kalziumkompartiment näher zu bestimmen und
 - b) die Auswirkungen sogenannter Kalzium-ATPase-Hemmstoffe auf die transmembranalen Kalziumverschiebungen zu untersuchen,
- um zur Erklärung der Koppelung von Erregung und Kontraktion am glatten Muskel beizutragen.

2. Methoden

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit Muskelstreifen der *Taenia coli* des Meerschweinchens durchgeführt.

Zur Gewinnung der Präparate wurden ca. 400 gr schwere Meerschweinchen beiderlei Geschlechts durch Genickschlag getötet und das Abdomen eröffnet. Unter ständiger Befeuchtung mit Krebslösung wurden die Taenien vom Caecum abpräpariert und in 2 cm lange Stücke geschnitten. Nachdem sie an beiden Enden angeschlungen und unter einer isometrischen Spannung von ca. 2 gr an Teflonstäben fixiert worden waren, wurden sie in die Badegefäße verbracht.

Diese waren doppelwandig konstruiert, so daß eine im Mantel zirkulierende Thermostatflüssigkeit die Temperatur der Badelösung stets auf $36 \pm 0,2^{\circ} \text{C}$ halten konnte. Die Begasung (95 % O_2 und 5 % CO_2 bzw. 100 % O_2) erfolgte kontinuierlich über eine am Boden des Gefäßes befindliche Fritte. Der Badewechsel wurde entweder durch Umstecken der Teflonstäbe oder über eingebaute Ventile vorgenommen.

Bei mechanischen Versuchen wurde das eine Ende der Taenie mittels einer kurzen Fadenschlinge an einem in die Lösung tauchenden Glashaken befestigt. Das andere Ende wurde mit einem Seidenfaden an einem über dem Badegefäß befindlichen isometrischen Kraftaufnehmer (HF-Modem/Hugo-Sachs Elektronik) fixiert. Die verstärkten Signale konnten mit einem Direktschreiber (Rikadenki B 36 Mark II) aufgezeichnet werden.

Die Bestimmung der austauschbaren Kalziumfraktionen erfolgte mit Hilfe der Lanthanummethode (20, 24, 25, 130) an mit $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ Verapamil inaktivierten Taenien.

Dieselbe Methode wurde zur Bestimmung des Rest-ECR durch 14 C-Sorbit angewandt ebenso wie zur Überprüfung der Wirkung von einigen Kalzium-ATPase Hemmstoffen, wobei ein Versuchsteil zur Erhöhung der $[\text{Ca}]_i$ mit Hilfe von erhöhtem extrazellulärem Kalium vorgeschaltet wurde.

Am Ende der Auswaschphase, die in $3 \times 250 \text{ ml}$ 10 mmol/l La^{3+} haltiger, kalziumfreier Hepes-Krebslösung erfolgte, wurden die Taenien knapp innerhalb der Haltefäden abgeschnitten und zwischen Filterpapier durch leichten Fingerdruck getrocknet. Anschließend wurde das Feuchtgewicht auf einer Cahn Minibalance Waage

(Mod. 7550) bestimmt. Die Gewebe wurden mit 50 μ l aqua bidest. erneut befeuchtet und mit 1 ml Protosol bei 65° C ca. 12 Stunden lang "verdaut". Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben mit 8 ml Toluol-Scintillationsgemisch versetzt, und die aufgenommene 45 Ca-Aktivität in einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer (Mod. 3320) gezählt. Aus der gleichzeitig durchgeführten Standardwertbestimmung konnte einerseits bei bekannter extrazellulärer Kalziumkonzentration das im Gewebe vorhandene Kalzium pro kg FG und andererseits die Größe des verbleibenden Sorbitraumes errechnet werden.

Folgende Lösungen wurden verwendet, wobei die Konzentrationen in mmol/l angegeben sind:

Krebslösung:	Na ⁺	137,0	Cl ⁻	147,3
	K ⁺	5,9	H ₂ PO ₄ ⁻	1,2
	Mg ⁺⁺	1,2	HCO ₃ ⁻	15,5
	Ca ⁺⁺	2,5	Glucose	11,5

Diese Lösung wurde mit 95 % O₂ und 5 % CO₂ begast; Sie diente zur Aufbewahrung der Taenien nach der Präparation und Herstellung einheitlicher Versuchsvoraussetzungen.

Hepes-Krebslösung:	Na ⁺	135,3	Cl ⁻	147,3
	K ⁺	5,9	Glucose	11,5
	Mg ⁺⁺	1,2	Hepes	5,8
	Ca ⁺⁺	2,5		

Alle Hepes gepufferten Lösungen wurden mit 100 % O₂ begast; diese Lösung diente als Basislösung für alle durchgeführten Versuche. Notwendige Änderungen von Ionenkonzentrationen (K⁺, Ca⁺⁺ usw.) erfolgten durch Austausch äquimolarer Mengen NaCl.

Auswaschlösung:

kalziumhaltig	Na ⁺	116,3	La ³⁺	10,0
	K ⁺	5,9	Cl ⁻	157,3
	Mg ⁺⁺	1,2	Glucose	11,5
	Ca ⁺⁺	2,5	Hepes	5,8

kalziumfrei	Na ⁺	118,8	La ³⁺	10,0
	K ⁺	5,9	Cl ⁻	154,8
	Mg ⁺⁺	1,2	Glucose	11,5
			Hepes	5,8

Vor Beginn des eigentlichen Auswaschvorganges über 3 x 15 Minuten in jeweils 250 ml kalziumfreier Auswaschlösung erfolgte eine vierminütige Äquilibration in Anwesenheit von Kalzium und Lanthanum, um einen plötzlichen zellulären Kalziumverlust beim Badwechsel zu vermeiden.

Radioaktiv markierte Lösungen hatten eine spezifische Aktivität von 0,3 uC/ml von ⁴⁵Ca bzw. 0,3 uC/ml von ¹⁴C enthaltenden Sorbit.

Verwendete Substanzen:

ATP: Adenosin-5 Triphosphorsäure Dinatriumsalz (Merck)

Chlorpromazin: Megaphenhydrochlorid (Bayer)

Isoprenalin: DL-Isopropylarterenol-HCl (Serva)

Hepes: N-2-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Serva)

Hyaluronidase: Kinetin (Schering)

Protosol: Tissue and Gel Solubilizer (New England Nuclear

Pilot Chemicals-Division)

Ruthenium-Rot: Ru₂ 6 (OH)₂ Cl₄ x 7 NH₃ x 3 H₂O (Merck)

Verapamil: Isoptin Hydrochlorid (Knoll)

¹⁴C Sorbit und

⁴⁵Ca (Radiochemical Center/Amersham).

3. Ergebnisse

3.1 Austauschbare Kalziumfraktion

3.1.1 Abhängigkeit von $[Ca]_e$

Die an der glatten Muskelzelle unter Einwirkung von Verapamil (bzw. D 600) austauschbare Kalziumfraktion wurde von Mayer et al (130) nur bei einer $[Ca]_e$ von 2,5 mmol/l beschrieben.

Um zu prüfen, wie diese Fraktion der Kalziumaußenkonzentration folgt, wurden die Gewebe 20, 60 und 120 min. in 45 Ca markierten Lösungen inkubiert.

Folgende Kalziumkonzentrationen wurden untersucht:

0,1 mmol/l	1,0 mmol/l	5,0 mmol/l
0,3 mmol/l	2,5 mmol/l	7,0 mmol/l
0,7 mmol/l	3,0 mmol/l	10,0 mmol/l

Bei allen Versuchsansätzen betrug die 45 Ca-Aktivität 0,3 μ C/ml. Die Taenien waren durch Zugabe von 2×10^{-5} mol/l Verapamil inaktiviert.

Abb. 2 zeigt mit guter Korrelation eine lineare Zunahme der austauschbaren Kalziummenge in Abhängigkeit von der verwendeten $[Ca]_e$. Signifikante Unterschiede zwischen den 20- und 60 min. Werten, sowie den 60- und 120 min. Werten bestehen nicht, so daß bei allen drei Aufladezeiten eine weitgehende Sättigung des austauschbaren Kompartiments erfolgt sein mußte. Da auch Mayer et al (130) bei längeren Aufladezeiten keine weitere Zunahme erzielen konnten (siehe auch Abb. 1), führten wir unsere Versuche in der Regel mit 60 min. Ca-Aufladezeit durch.

Da sowohl das Gesamt-Gewebskalzium (84) als auch das austauschbare Kalzium in gleichem Maße von der $[Ca]_e$ abhängig sind, muß sich das austauschbare Kalzium in einem Kompartiment befinden, das mit dem ECR in Verbindung steht.

3.1.2 Verhältnis von $[Ca]_i : [Ca]_e$

Bei steigender $[Ca]_e$ wird ein immer kleiner werdender Teil des angebotenen Kalziums in das Gewebe aufgenommen (84). Ähnlich wie diese Autoren berechneten wir das prozentuale Verhältnis zwischen aufgenommenen Kalzium und der verwendeten Kalziumaußenkonzentration. Das Ergebnis zeigt die folgende Tabelle.

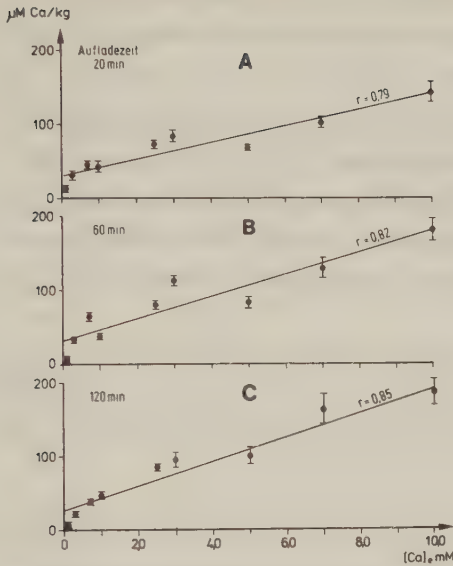


Abb. 2: Kalziummenge pro kg FG im Gewebe der durch Verapamil inaktivierten *Taenia coli* (nach Behandlung mit der Lanthanummethode) in Abhängigkeit von der $[Ca]_e$. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 7 Einzelmessungen berechnet.

$[Ca]_e$ mmol/l	$[Ca]_i$ mmol/l	n	$[Ca]_i : [Ca]_e$ %
0,1	7,7	10	7,70
0,3	21,5	10	7,16
0,7	38,7	9	5,60
1,0	46,9	7	4,69
2,5	84,8	10	3,39
3,0	99,2	9	3,30
5,0	99,9	8	1,98
7,0	162,0	7	2,31
10,0	185,0	10	1,85

Tabelle: Austauschbare Kalziummenge pro kg FG ($= [Ca]_i$) bei Anwendung der Lanthanummethode. Aufladezeit 120 min in 45 Ca-markierter Lösung. In der rechten Spalte ist das Prozentverhältnis von $[Ca]_i : [Ca]_e$ berechnet.
n = Anzahl der Einzelversuche.

Wären beide Kompartimente frei zugänglich und austauschbar, müßte das Verhältnis von $[Ca]_i : [Ca]_e$ entsprechend dem Volumenverhältnis beider Verteilungsräume gleichbleiben.

Aus der Tabelle geht hervor, daß bei niedrigen $[Ca]_e$ ein relativ größerer Anteil des ausgetauschten Kalziums errechnet wird. Im Bereich physiologischer $[Ca]_e$ wird mit der Lanthanummethode ein austauschbares Kalziumkompartiment bestimmt, das mit $84,8 \mu\text{mol/kg FG}$ ca. 10 % des im ECR vorhandenen Kalzium (v. Breemen et al (23) - $0,8 \text{ mmol Ca}^{++}/\text{kg FG}$, Goodford (78) - $1,0 \text{ mmol Ca}^{++}/\text{kg FG}$) entspricht.

Unterstellt man, daß das Prozentverhältnis von $[Ca]_i : [Ca]_e$ neben dem Konzentrationsverhältnis auch ein Raumverhältnis angibt, so füllt ein solcher Kalziumraum gerade im Bereich physiologischer Konzentrationen ebenfalls ca. 10 % des ECR aus.

3.1.3 Sorbitraumbestimmung bei Anwendung der Lanthanummethode (Rest ECR)

Um den bisher erhaltenen "Kalzium-Räumen" auch einen Realraum gegenüberstellen zu können, haben wir versucht, diese Räume mit dem ECR-Markierungsstoff Sorbit nachzuweisen.

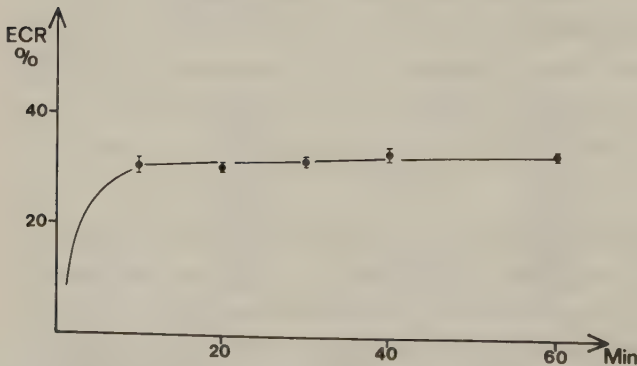


Abb. 3: ECR-Bestimmung mit ^{14}C -Sorbit bei Verwendung HEPES-gepufferter Lösungen. Sorbitaufnahme in Prozent des FG in Abhängigkeit von der Aufladezeit. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 8 Einzelmessungen berechnet.

Wenn die mit der Lanthanummethode an inaktivierten Taenien bestimmte Kalziumfraktion sich in einem mit dem ECR in Verbindung stehenden Kompartiment befindet, müßte dieses auch von ^{14}C -Sorbit besetzbar sein und ebenfalls durch Lanthanum zu sequestrieren sein.

In einem Vorversuch wurde der ECR in Hepes-Krebslösung mit ^{14}C -Sorbit bestimmt. Abb. 3 zeigt, daß bereits nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten ein konstanter Wert von 33 % des Feuchtgewichtes erhalten wird. Dieser Wert stimmt gut mit anderen in der Literatur veröffentlichten Werten überein (79, 80, 176).

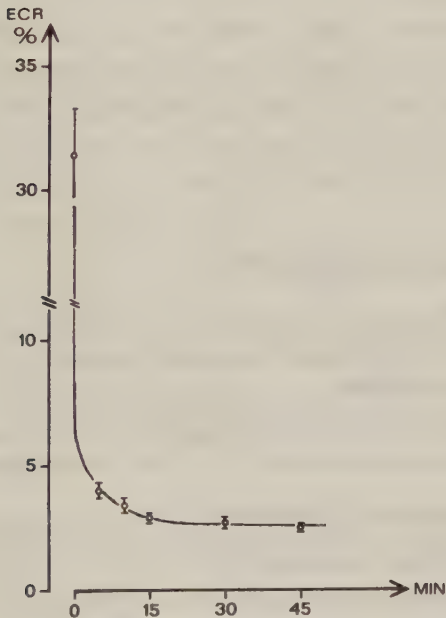


Abb. 4: Rest ECR-Bestimmung mit ^{14}C -Sorbit (Aufladezeit 60 min.) in Abhängigkeit von der Auswaschzeit in Hepes-Krebslösung. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 5 Einzelmessungen berechnet.

Daraufhin wurde das Verhalten des Sorbit Raumes bei verschieden langem Auswaschen (0-45 Min.) in Hepes-Krebs-Lösung bestimmt. Abb. 4 zeigt, daß nach 45 min. Auswaschzeit ein Plateau bei 2,8 % des FG erreicht wird, wenn die Taenien 60 min. aufgeladen wurden. Ein völliges Auswaschen war nicht möglich.

Anschließend haben wir den Rest ECR entsprechend den Kriterien der Lanthanum-methode bestimmt. Hierbei wurden die Gewebe in mit 14 C-Sorbit markierter Hepes-Krebslösung 60 min äquilibriert und 45 min in 10 mmol/l La^{3+} - haltiger Lösung ausgewaschen. Gegenüber dem Auswaschen ohne Lanthanum wurde mit 3,3 % des FG ein signifikant höherer Wert gemessen. Insgesamt kann durch Lanthanum ein Raum von 10 % des ECR sequestriert werden. Dieser ist in Abb. 5 A als Vergleichswert für die folgenden Versuche dargestellt.

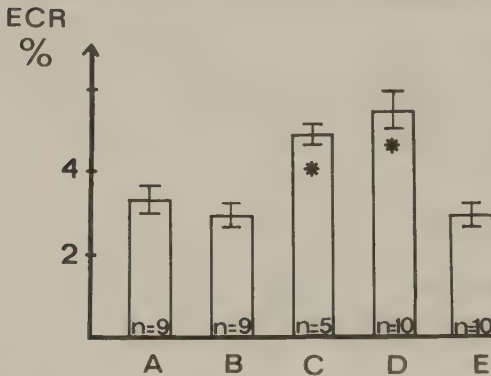


Abb. 5: Rest-ECR Bestimmung mit 14 C-Sorbit (Aufladezeit 60 min) bei Modifizierung der Auflade- bzw. Auswaschlösung (Auswaschzeit 45 min).

A: Auswaschen in La-Hepes-Krebslösung;

B: Markierung in Gegenwart von 10 mmol/l La^{3+} , Auswaschen wie bei A;

C: Auswaschen in natriumfreier La-Hepes-Krebslösung;

D: 20 min Vorinkubation in Hepes-Krebslösung + 15 I.U./ml Hyaluronidase; Auswaschen wie bei A;

E: Markierung wie bei D; Auswaschen in Hepes-Krebslösung.

* = signifikant unterschiedlich gegen Versuch A ($p < 0,01$). Versuch E signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$) gegen Versuch D.

Werte und mittlerer Fehler aus der jeweiligen Anzahl der Meßwerte (n) errechnet.

Zunächst sollte das Verhalten des Rest-Sorbit-Raumes untersucht werden, wenn bereits beim Aufladevorgang 10 mmol/l La^{3+} in der Badelösung vorhanden sind.

Würden durch Lanthanum Membrandefekte gesetzt und die im vorhergehenden Versuch gemessene Rest-ECR Erhöhung damit auf passiven Diffusionsprozessen in das Zellinnere beruhen, müßten die Meßwerte bei dieser Versuchsanordnung

besonders stark steigen. Aus Abb. 5/B ist zu entnehmen, daß geringfügig weniger Sorbit im Gewebe verbleibt, wenn die Markierung mit ^{14}C -Sorbit in Gegenwart von 10 mmol/l La^{3+} erfolgt ($p = 0,3$).

Dies untermauert die Annahme, daß Lanthanum tatsächlich bestimmte Kompartimente des ECR sequestrieren kann, die für eine spätere ^{14}C -Sorbitaufnahme nicht mehr frei zugänglich sind. Eventuell auftretende Strukturläsionen sind mit dieser Methode jedoch nicht auszuschließen.

Glattmuskuläre Gewebe zeigen eine erhebliche Zunahme von Kalzium in natriumfreier Badelösung, die auf einer Zunahme von freien Membranbindungsstellen beruhen soll (41). Da die beschriebene Mehraufnahme auch durch ECR-Veränderungen bedingt sein könnte, haben wir den Rest-Sorbitraum nach Auswaschen in natriumfreier Hepes-Krebs-Lösung bestimmt. Abb. 5/C zeigt unter diesen Versuchsbedingungen eine signifikant höhere Sorbitaufnahme. Es ist aber nicht anzunehmen, daß die Zellmembran bereits nach kurzer Zeit in natriumfreier Lösung für Sorbit wesentlich durchlässiger wird; somit müßte eine Raumvergrößerung stattgefunden haben.

Es wäre jedoch auch eine intrazelluläre Aufnahme des Sorbit durch pinozytische Aktivität der Zellwand denkbar. Die dort befindlichen Caveolae besitzen aber nach Gabella (69) keine derartige Möglichkeit. Da sie extrem enge Eingangsöffnungen von nur wenigen Nanometern Durchmesser haben, könnten Lanthanumionen diese Öffnung verstopfen und so zur Sequestrierung von ECR-Anteilen beitragen.

Wenn das morphologische Substrat des Rest-Sorbitraumes in den Caveolae der Zellmembran zu suchen sein sollte, müßten Strukturveränderungen in diesem Bereich den Rest-Sorbitraum beeinflussen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß durch Vorbehandlung der Taenien mit Hyaluronidase die Caveolaehälse geöffnet werden können (69) und ein signifikant größerer Inulinraum an der Taenia coli erhalten wird (80). Eine Zellwandzerstörung tritt bei der verwendeten Konzentration von 15 I.U./ml nicht auf (69). Wir untersuchten Taenien, die wie üblich vorbereitet waren, jedoch 20 Minuten in Hepes-Krebslösung äquilibriert wurden, die 15 I.U./ml Hyaluronidase enthielt und nach dem Aufladen in ^{14}C -Sorbit markierter Hepes-Krebslösung entsprechend der Lanthanummethode

weiter behandelt wurden. Das Versuchsergebnis (Abb. 5/D) zeigt, daß gegenüber dem Auswaschen in Anwesenheit von Lanthanum ohne vorherige Hyaluronidasebehandlung (Abb. 5/A) ein wesentlich größerer Rest-Sorbitraum erhalten wird ($p < 0,001$). Dies bedeutet, daß der Sorbit leichter in die unter Hyaluronidase eröffneten Räume eindringen konnte und dort während der Behandlung mit Lanthanum eingefangen wurde.

Diese Erhöhung war nicht erwartet worden, da wir davon ausgingen, daß die Caveolae durch Hyaluronidase eröffnet seien und, ähnlich wie von Gabella (69) beschrieben, in einem wellenförmigen Zustand verharren würden. Dies hätte nach dem Auswaschen zu einem kleineren Sorbitraum führen müssen. Zur Prüfung, ob eine erhöhte Membrandurchlässigkeit oder eine "Regeneration" der Caveolae, verbunden mit einer Abdichtung durch Lanthanum hierfür verantwortlich sei, haben wir den Versuch wiederholt und als Auswaschlösung lanthanumfreie Hepes-Krebslösung verwendet. Wenn eine Membranschädigung der Grund für die Erhöhung ist, müßte die gleiche Menge Sorbit wie im Vorversuch (5/D) in die Zelle penetriert sein; kommt es zu einer Regeneration der Caveolae kann ein Sorbitraum in der Größenordnung wie bei Abb. 4 (45 min. Auswaschzeit) erwartet werden.

Abb. 5/E zeigt, daß der nun erhaltene Rest ECR signifikant niedriger als im Vorversuch ($p < 0,001$) ist und gering über dem Auswaschwert ohne Lanthanum (Abb. 4) liegt. Auch dieses Ergebnis läßt auf einen Einfangeffekt der Caveolae schließen, die sich unter Hyaluronidase öffnen und in Normallösung ihre ursprüngliche Gestalt annehmen können.

Alle in Abb. 5 aufgeführten Versuche weisen auf ein mit dem ECR in Verbindung stehendes Kompartiment hin, das durch Lanthanum sequestriert werden kann, und in der Größenordnung der bisher beschriebenen Caveolae liegt.

3.1.4 Abhängigkeit des Rest ECR von $[Ca]_e$.

Wir haben geprüft, wie sich der mit 14 C-Sorbit bestimmte Rest-ECR bei Änderung der $[Ca]_e$ verhält. Abb. 6 zeigt eine deutliche Abnahme des Rest-ECR mit steigender $[Ca]_e$ wie sie bereits von v. Breemen (28) beschrieben wurde. Wesentlich niedrigere Rest-Sorbiträume werden gemessen, wenn die Aufladezeit nur 20 min. beträgt.

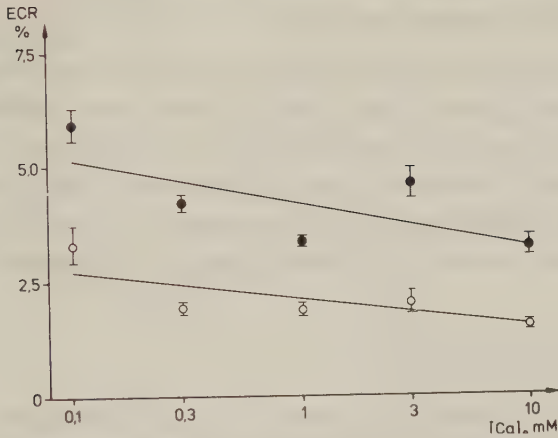


Abb. 6: Rest ECR-Bestimmung mit ^{14}C -Sorbit in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}]_e$ durch 45 min. Auswaschen in Lanthanum-Hepes-Krebslösung nach 20 min. (○) und 60 min. (●) Aufladezeit. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 8 Einzelmessungen berechnet.

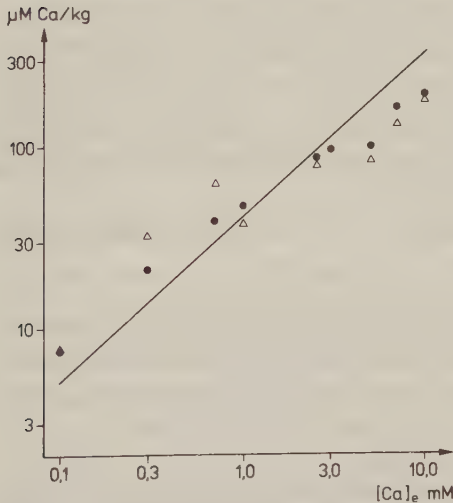


Abb. 7: Logarithmische Darstellung der Korrelation zwischen Kalziummenge pro kg FG nach 60 min. (Δ) bzw. 120 min. (●) Aufladezeit und eines mit Hilfe des ^{14}C -Sorbitraumes und der $[\text{Ca}]_e$ errechneten Kalziumraumes (eingezeichnete Gerade).

Aus dem gemessenen Rest-Sorbitraum und der jeweils bekannten $[Ca]_e$ läßt sich eine im Gewebe befindliche Kalziummenge errechnen.

Wir haben in Abb. 7 eine derart berechnete Gerade eingezeichnet und den vorher gemessenen Kalziumaufnahmewerten (vergl. Abb. 2) gegenübergestellt. Es zeigt sich, daß insbesondere im Bereich physiologischer $[Ca]_e$ identische Kompartimente beschrieben werden. Dies bedeutet, daß eine mit Hilfe der Lanthanummethode an inaktiven Taenien bestimmte "intrazellulär austauschbare" Kalziumfraktion durch ein extrazelluläres, von Sorbit erreichbares, Kompartiment dargestellt werden kann.

3.2 Transmembranaler Kalziumtransport

Unabhängig von der geringen Membranpermeabilität, die an der inaktiven glatten Muskelzelle angenommen werden kann, muß für Kalzium ein Mechanismus vorhanden sein, der dessen großen Gradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum aufrecht erhält. Wie bereits erwähnt, konnte von verschiedenen Autoren die Theorie einer Natrium-Kalzium-Austauschdiffusion nicht unterstützt werden. Viele Untersuchungsergebnisse sprechen dagegen für ein metabolisches und energieabhängiges Geschehen. Dies wäre mit Hilfe einer Kalziumpumpe möglich, deren Existenz durch geeignete Pharmaka über Hemmung oder Förderung nachzuweisen bzw. auszuschließen wäre. Durch die Lanthanummethode ist es möglich, die geringen zu erwartenden Änderungen des austauschbaren Kalziumanteils zu erfassen.

3.2.1 Erhöhung der $[Ca]_i$ in Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration

Um ein zellauswärts gerichtetes "Auspumpen" beobachten zu können, mußte zuerst eine größere intrazelluläre Kalziumkonzentration aufgebaut werden. Dies geschah durch stufenweise Erhöhung der Kaliumkonzentration in der mit ^{45}Ca markierten Badelösung.

Abb. 8 zeigt die Aufnahmekurven, die nach verschieden langem Aufladen der Taenien in Hepes-Krebslösung mit variabler Kaliumkonzentration und anschließend 45 min. Auswaschen in Lanthanum-Hepes-Krebslösung gewonnen wurden. Eine für unsere Versuche ausreichende Erhöhung der $[Ca]_i$, die bei etwa $50 \mu\text{mol/kg FG}$

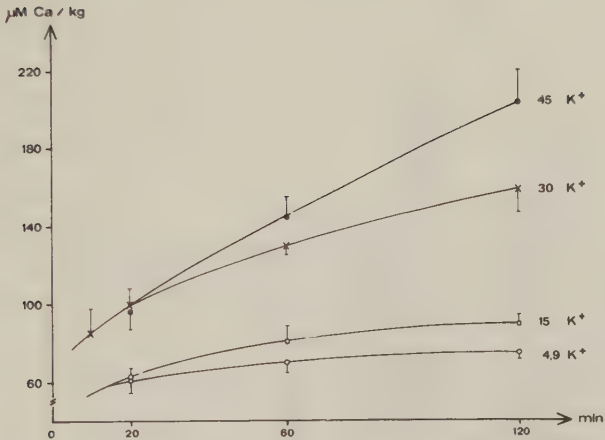


Abb. 8: Kalziumaufnahme bei unterschiedlichen Kaliumkonzentrationen (mmol/l) in der Badelösung nach 45 min. Auswaschen in Lanthanum-Hepes-Krebslösung in Abhängigkeit von der Aufladezeit. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 9 Einzelmessungen berechnet.

über den Normalwerten liegen sollte, konnte nach 60 min. Aufladezeit unter 30 mmol/l K⁺ erhalten werden. Da durch diese Kaliumkonzentration der ECR nicht wesentlich verändert wird, muß die gemessene Kalziumerhöhung im intrazellulären Raum stattgefunden haben.

3.2.2. Wirkung von Pharmaka, die die Spontanaktivität unterdrücken

Wir haben hierzu alle verwendeten Taenien wie oben beschrieben während 60 min. in einer 45 Ca markierten Hepes-Krebslösung aufgeladen, die 30 mmol/l K⁺ enthielt. Während bei einer Kontrollgruppe sofort die erhaltene $[Ca]_i$ bestimmt wurde, konnten bei den Versuchsgruppen verschiedene Pharmaka für 30 min. auf die Taenien einwirken, wobei die spezifische Kalziumaktivität in der Badelösung nicht verändert wurde. Wie Abb. 9 zeigt, führen Substanzen, die die SA unterdrücken (Verapamil $2,2 \times 10^{-5}$ mol/l und Isoprenalin $3,6 \times 10^{-6}$ mol/l) ebenso wie 5×10^{-5} mol/l ATP zu einer deutlichen Verminderung der $[Ca]_i$.

Während bei Anwesenheit von Isoprenalin nur eine kleine Menge Kalzium aus der

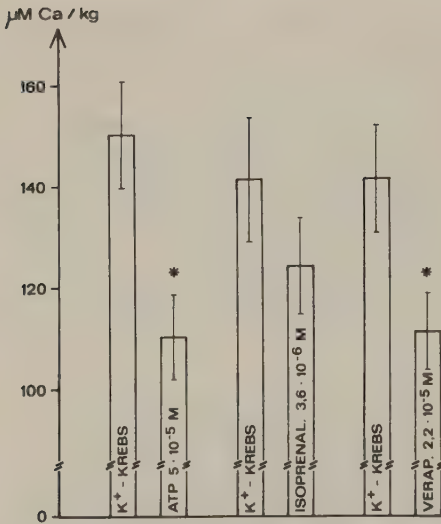


Abb. 9: Abnahme der $[Ca]_i$ pro kg FG (= Förderung eines hypothetischen Auspumpvorganges) der in 30 mmol/l K^+ Hepes-Krebslösung vorinkubierten Muskelzellen. K^+ -Krebs=Kontrollgruppe und Ausgangswert des jeweiligen Versuches (60 min. Aufladezeit). Während weiterer 30 min. Zugabe der jeweils angegebenen Substanz. * = signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber dem Ausgangswert. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 10 Einzelmessungen berechnet.

Zelle gepumpt wurde, war der Abfall des intrazellulär ausgetauschten Kalziums bei Verapamil und ATP gegenüber den Kontrollwerten signifikant erniedrigt. Dies bedeutet, daß in Gegenwart von diesen Substanzen ein vermehrter Kalziumtransport aus der Zelle möglich war bzw. eine zellauswärts gerichtete Pumpe gefördert worden ist.

3.2.3 Wirkung von Pharmaka, die als ATPase Hemmstoffe gelten

Zur Hemmung der Kalziumpumpe wurde Ruthenium-Rot verwendet, von dem bekannt ist, daß es an verschiedenen Zellfraktionen die kalziumaktivierte ATPase hemmt (128, 167, 168, 170). Als Vergleichssubstanz wurde Chlorpromazin herangezogen, das die passive Bindung von Kalziumionen an das SR behindert (9, 175). Ruthenium-Rot war in einer Konzentration von 0,1 mmol/l und Chlorpromazin in einer Konzentration von 10^{-5} mol/l in der Auspumplösung vorhanden.

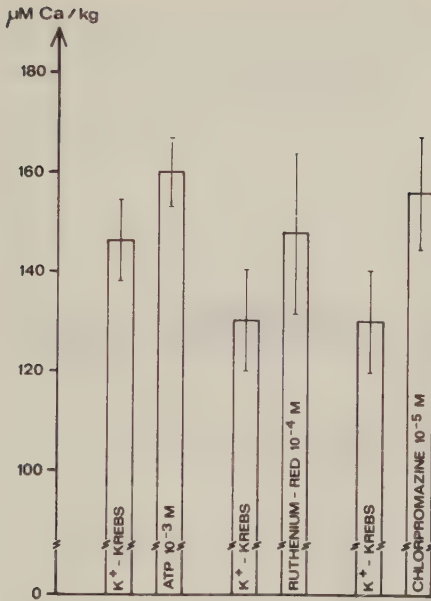


Abb. 10: Zunahme der $[\text{Ca}]_i$ pro kg FG von Muskelzellen der *Taenia coli*. Vorkubation in 30 mmol/l K^+ - Hepes-Krebslösung; 30 min. Zugabe der jeweils angegebenen Substanz. Unterschiede gegenüber den Ausgangswerten (K^+ - Krebs) sind nicht signifikant. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 10 Einzelmessungen berechnet.

Abb. 10 zeigt, daß ein Auspumpen in Anwesenheit dieser Substanzen nicht mehr stattfindet; vielmehr können während 30 min. ca 9 - 12 μmol Kalzium pro kg FG zusätzlich in die Zelle gelangen.

Ebenfalls ist in Abb. 10 die Wirkung von 1 mmol/l ATP dargestellt, welches in dieser Konzentration an der *Taenia coli* das inhibitorische Potential hemmen kann und zu erhöhter SA führt (160). Im Gegensatz zu 5×10^{-5} mol/l ATP wird der Kalziumauswärtstransport bei dieser Konzentration gehemmt und eine geringe intrazelluläre Kalziumerhöhung beobachtet.

Wenn die als Hemmer des Kalziumauswärtstromes angesehenen Substanzen bereits in der Aufladelösung vorhanden sind, müßte die erreichte $[\text{Ca}]_i$ gegenüber den Kontrollwerten in Hepes-Krebslösung signifikant höher sein.

Wie Abb. 11 zeigt, ist dies nur für 1 mmol/l ATP nachweisbar.

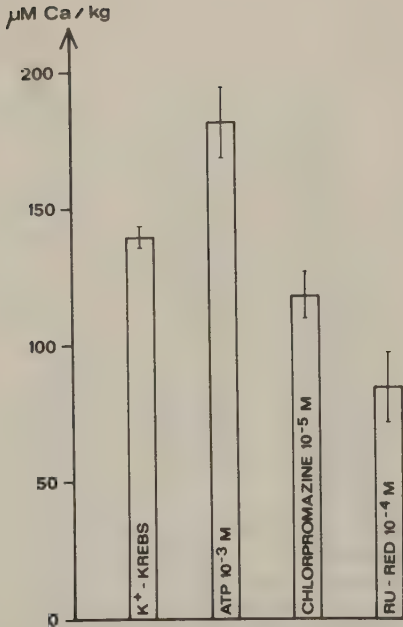


Abb. 11: Beeinflussung der $[Ca]_i$ gemessen pro kg FG an Muskelzellen der *Taenia coli*. Vergleichswert (K^+ - Krebs) 60 min. Aufladezeit in 30 mmol/l K^+ -Hepes-Krebslösung. Die angegebenen Substanzen wurden bereits in die Aufladelösung gegeben. Werte und mittlerer Fehler aus mindestens 10 Einzelmessungen berechnet.

Bei Zugabe von Chlorpromazin bzw. Ruthenium-Rot in das Aufladebad ergibt sich jedoch eine deutlich niedrigere $[Ca]_i$. Dies bedeutet, daß es bereits während des K^+ -induzierten Aufladens zu einem geringeren Kalziumeinstrom gekommen sein mußte. Somit können Chlorpromazin und Ruthenium-Rot weniger mit einer Kalziumpumpe interferieren als vielmehr Kalziumbindungsstellen an verschiedenen Orten der Zelle besetzen, sodaß eine Kalziumaufnahme dorthin erschwert wird.

3.2.4. Beeinflussung der mechanischen Aktivität durch ATPase-Hemmstoffe

Wir haben mechanische Versuche durchgeführt, um unsere bisherigen hypothetischen Überlegungen durch den Verlauf der SA unter Einwirkung der bereits ver-

wendeten Pharmaka bestätigen zu können.

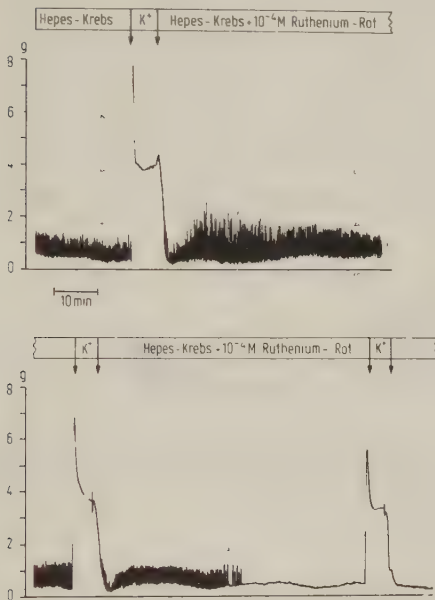


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Spontanaktivität und der Kontraktionsmaxima der glatten Muskelzellen der Taenia coli unter Zugabe von 10^{-4} mol/l Ruthenium-Rot. Muskelspannung gemessen in g.

Die Abb. 12 u. 13 zeigen, daß sowohl bei Ruthenium-Rot als auch bei Chlorpromazin die KCl-induzierten Kontraktionen kleiner werden, was auf eine Verringerung des intrazellulär verfügbaren Kalziums schließen läßt.

Ebenfalls wird der tonische Kontrakturanteil, wie dies bereits am ductus deferens des Meerschweinchens unter Chlorpromazin beschrieben wurde (177) deutlich unterdrückt. Nach allgemeiner Auffassung beruht der tonische Anteil der Kontraktur auf einem vermehrten transmembranalen Kalziumeinstrom. Dieser muß offensichtlich durch beide Substanzen reduziert worden sein.

Bei den verwendeten Konzentrationen von Ruthenium-Rot und Chlorpromazin ist zumindest in den ersten 60 min. eine SA möglich. Dies scheint darauf zu beruhen, daß intrazelluläre Kalziumbewegungen nicht beeinflußt werden.

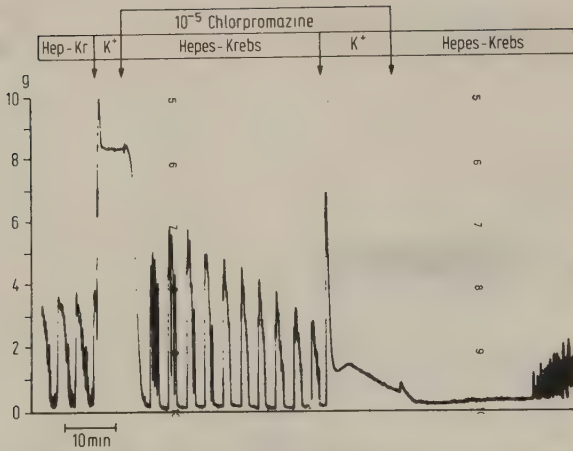


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Spontanaktivität und der Kontraktionsmaxima der glatten Muskelzellen (*Taenia coli*) unter Einwirkung von 10^{-5} mol/l Chlorpromazin. Muskelspannung gemessen in g.

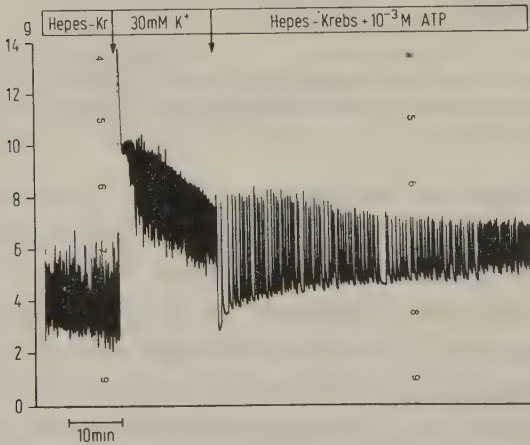


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Spontanaktivität der *Taenia coli* nach einer KCl-induzierten Kontraktur bei Zugabe von 10^{-3} mol/l ATP. Muskelspannung gemessen in g.

Wir haben weiterhin geprüft, wie sich die SA unter ATP in der Konzentration von 1 mmol/l verhält. Abb. 14 zeigt, daß nach einer KCl - induzierten Kontraktur die SA durch 1 mmol/l ATP kaum beeinflußt wird. Die beobachtete Anhebung der Aktivitätsmittellage dürfte Folge der in Abb. 10 u. 11 dargestellten Erhöhung des intrazellulären Kalziums bei dieser ATP Konzentration sein. In unseren Versuchen wurde die Spontanaktivität aufrechterhalten, wenn zusätzlich 30 mmol/l KCl zugegeben wurden (ohne Abb.). Die Unterdrückung der durch KCl induzierten Kontraktur kann durch die vorliegenden Versuche nicht erklärt werden.

4. Diskussion

4.1. Zur Methodik

4.1.1. Anwendungsbereich der Lanthanummethode

Zur näheren Beschreibung und Charakterisierung der Orte, die im Bereich der glatten Muskelzellen für die Freisetzung des für den Kontraktionsvorgang notwendigen Kalziums vorhanden sein müssen, wurden vielerlei Versuche unternommen. Hierbei wurden, vor allem Efflux-Experimente durchgeführt, bei denen aus dem Verlauf der Auswaschkurve auf einzelne Kalziumkompartimente zurückgerechnet wurde. Für die nicht befriedigenden Ergebnisse war vor allem die große Kalziumspeicherkapazität des ECR verantwortlich (24), durch die unspezifische Kalziumbewegungen verursacht werden und eine Verdeckung der geringen zu erwartenden Kalziumflüsse in Kauf genommen werden mußte. Weiterhin wurde das Ergebnis durch die Benutzung kalziumfreier Auswaschlösungen verfälscht, da Kalzium in hohem Maße seine eigene Membranpermeabilität kontrolliert (16, 25, 35, 47, 148).

Der beobachtete Kalziumefflux kann nicht durch eine Kinetik 1. Ordnung beschrieben werden (22, 75). Es scheint, daß mit der Lanthanummethode die Möglichkeit gegeben ist, den transmembranalen Kalziumaustausch kurzfristig zu blockieren, und die so "eingefangene", austauschbare Kalziumfraktion zu messen.

4.1.2. Nachteile der Lanthanummethode

Es kommt zu keiner vollständigen Hemmung des transmembranalen Kalziumflusses (28, 172) und Lanthanum kann einige Kalziumbindungsstellen nur sehr langsam erreichen (65). Mayer et al (130) lösten das Problem wie bereits beschrieben, indem sie einen der "zellulären, austauschbaren Kalziumfraktion" entsprechenden Wert nach einer Auswaschzeit von 45 min. in Gegenwart von La^{3+} bestimmten.

Zu einer ausreichenden Blockierung des transmembranalen Kalziumflusses ist die von uns verwendete Lanthanumkonzentration von 10 mmol/l nötig (42, 37, 130). Bei dieser Konzentration wird der während einer Kaliumkontraktur auftre-

tende hohe Kalziumeinstrom zum größten Teil blockiert. Der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus geht aus der Literatur nicht eindeutig hervor. Unspezifische Lanthanumeffekte, wie z.B. Membranstabilisierung (43, 172) wurden ebenso wie die Möglichkeit der Hyperpolarisation am Hummeraxon (158) hierfür verantwortlich gemacht.

Marschall & Kroeger (129) war es nicht möglich, durch Zugabe von 2 mmol/l La^{3+} zu einer 2,5 mmol/l Ca^{++} enthaltenden Badelösung eine Änderung des Membranpotentials zu beobachten. Dies ist auffällig, da bereits 12,5 mmol/l Ca^{++} eine deutliche Membranpotentialänderung verursachen, obwohl Lanthanum in dieser Hinsicht 20 mal effektiver als Kalzium ist (158). An der glatten Uterusmuskulatur kommt es zu einer Kalziuminfluxhemmung innerhalb von 4 bis 5 min. durch 2,4 mmol/l La^{3+} (1). Unter anderem ist der von der $[\text{Ca}]_e$ abhängige Kalzium-einwärtsstrom am Uterusmuskel, der unter Voltage-clamp-Bedingungen gemessen wird, durch 2,5 mmol/l La^{3+} hemmbar (132). An der glatten Trachealmuskulatur ist nach 30 min. Inkubation in 5 mmol/l La^{3+} enthaltender Badelösung eine Kontraktionsantwort auf Tetraäthylamoniumchlorid nicht mehr zu erhalten (107). Auf Acetylcholin und Histamin kann in Gegenwart derselben Lanthanumkonzentration eine, wenn auch deutlich verminderte Kontraktion gesehen werden, was bedeutet, daß die kontraktilen Proteine auch bei Lanthanumbehandlung aktivierbar bleiben und die eventuell hierzu erforderlichen Kalziumflüsse nicht vollständig gehemmt werden.

Kirkpatrick (107) schloß aus den eben angeführten Versuchen, daß Lanthanum nur den transmembranalen Austausch von Kalzium behindert. In der Elektronenmikroskopie benütztes kolloidales Lanthanum scheint nicht in glatte Gefäßmuskulazellen einzudringen (51). Auch kann es an der Uterusmuskulatur, höchstens in ionisierter Form in das Zellinnere eindringen (88). Die in einer 2 und 10 mmol/l La^{3+} enthaltenden Badelösung nach 2 Stunden auftretende Kontraktur könnte als eine Folge des intrazellulären Eindringens von Lanthanumionen gedeutet werden (130). Wegen eines Ansteigens der Kalziumeffluxrate nach Zugabe von 2 mmol/l La^{3+} unterstützten Freeman und Daniel (65) die These, daß Lanthanum in die Zelle eindringt und dort zur Kalziumverdrängung führt. Andere Autoren waren der Ansicht, daß Lanthanum die Zellwand überhaupt nicht oder nur in vernachlässig-

bar kleinen Mengen durchdringt (24, 53, 69, 119).

Wegen der Verwendung von Hepespuffern mußten die Badelösungen phosphat- und bikarbonatfrei gehalten und mit 100 % O_2 begast werden. Hierdurch ist eine Beeinträchtigung der Versuchsergebnisse durchaus möglich, kann aber aus der vorhandenen Literatur qualitativ und quantitativ nicht belegt werden. Zellen der *Taenia coli*, die in einer derartigen Lösung auf über $200 \mu\text{mol } Ca^{++}/\text{kg FG}$ aufgeladen waren, zeigten einen zellauswärts gerichteten Kalziumtransport (41) der von anderen Autoren (130) bei *Taenien*, deren Kalziumgehalt auf $170 \mu\text{mol } Ca^{++}/\text{kg FG}$ angehoben worden war, nicht bestätigt werden konnte.

Wenn *Taenien* von einer bikarbonat-gepufferten und mit 95 % O_2 sowie 5 % CO_2 begasten Lösung in eine tris-gepufferte, 100 % O_2 -begaste Badelösung verbracht wurden, trat eine elektrische Daueraktivität mit Ausbildung einer Kontraktur auf (171), was mit einer Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes erklärt wurde. Katase (102) machte für ähnliche Erscheinungen eine Kalziumpermeabilitätsänderung verantwortlich.

Eine um 30 % erhöhte Spikefrequenz wurde in phosphatfreien Lösungen gesehen (171). Da Abhängigkeiten zwischen Phosphorylierung mikromolarer Kalziummengen und der Aktivierung hochspezifischer, ATPasen gesteuerter Kalzium-Pumpssysteme an menschlichen Erythrozytenmembranen bestehen (104), vermuten wir eine Funktionseinschränkung dieses Systems unter Phosphat- und Bikarbonatmangel. Phosphatkonzentrationsänderungen in der Badelösung zeigen aber nach Karaki und Urakawa (101) keine signifikanten Änderungen im Gesamtkalziumgehalt der Zelle. Da in unseren Versuchen eine Kontraktur jedoch nur unmittelbar nach dem Übergang von Krebs- in Hepeskrebislösung auftrat und nach kurzer Zeit wieder die normale rhythmische Aktivität zum Tragen kam, nahmen wir an, daß durch die modifizierte Badelösung der Kalziumgehalt der Zelle nicht wesentlich verändert wird.

Bei Anwendung der Lanthanummethode wurde auch von Schädigungen einzelner Zellbestandteile berichtet. So sahen Löwe et al (123) eine Vakuolisierung der SR; die Größe der Membrancaveolae blieb jedoch erhalten (122). Eine unter $64 \text{ mmol/l } Ca^{++}$ beobachtete gleichartige Vakuolisierung des SR kann auf eine verstärkte

Membranstabilisierung zurückgeführt werden (69). Bei Auswaschversuchen in kalziumfreier Lösung wurden stark veränderte und durchlässige Zellmembranen gefunden (22), wogegen Mayer et al (130) zeigten, daß Lanthanum eher einen membranabdichtenden Effekt hat. Sie verglichen dabei Kalzium-Effluxkurven der *Taenia-colizellen* in 2,5 mmol/l Ca^{++} haltiger Hepes-Krebslösung und einer 10 mmol/l La^{3+} haltigen Hepes-Krebslösung und beobachteten einen langsameren 45 Ca Verlust bei Anwesenheit von La^{3+} . Sie fanden weiter, daß durch metabolische Hemmung geschädigte Zellmembranen bei Effluxexperimenten unter 10mmol/l La^{3+} einen wesentlich langsameren 45 Ca Ausstrom zeigten als in einer physiologischen Auswaschlösung.

Veränderungen des ECR treten während Lanthanumbehandlungen nicht auf (37, 43). Bei Anwendung der Lanthanummethode über 2 Stunden wurde der membranabdichtende Effekt von Lanthanum in Auswaschversuchen nachgewiesen (43). In Verbindung mit unseren Ergebnissen, bei denen in Lanthanumlösung vorinkubierte Taenien eine stark erniedrigte 14 C-Sorbitaufnahme zeigten, konnten wir davon ausgehen, daß Membranschädigungen während der von uns angewendeten Zeiten außer Betracht gelassen werden können.

4.1.3 Mögliche Fehler bei Verwendung von Sorbit zur ECR Bestimmung

Es kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß die Versuchsergebnisse mit 14 C-Sorbit durch ein Eindringen von Sorbit in die Zelle und dessen dortige Verstoffwechselung verfälscht wurden.

Jedoch erreicht der 14 C-Sorbitraum schon nach kurzer Äquilibrationszeit von 10 min. ein Plateau, das sich im Gegensatz zu Meßwerten bei Inulinraumbestimmungen nicht mehr signifikant verändert (80). Ähnliche Ergebnisse von Goodford (78) stehen in Einklang mit der von uns erhaltenen 14 C Sorbit-Aufnahmekurve. Sogar unter den Bedingungen der metabolischen Hemmung des Zellstoffwechsels tritt die Permeabilitätszunahme für 14 C Sorbit an der glatten Muskelzelle erst mit einer Verzögerung von 17 Minuten ein.

Während der von uns verwendeten Versuchsdauer dürfte also eine intrazelluläre Aufnahme von Sorbit und dessen Verstoffwechselung unwahrscheinlich sein.

4.2. Austauschbare Kalziumfraktion

Durch die Bestimmung der Kalziummengen in Abhängigkeit von der $[Ca]_e$ sollten nähere Aufschlüsse über die Austauschbarkeit dieser messbaren Restfraktion am glattmuskulären, mit Verapamil inaktivierten Gewebe gewonnen werden. Bei Mayer et al (130) waren durch D 600 (Methoxyderivat von Verapamil) inaktivierte Taenien in der Lage, ca. $80 \mu\text{mol } Ca^{++}/\text{kg FG}$ auszutauschen und zu speichern, ohne in Kontraktur überzugehen.

Durch die Annahme, daß mit der Lanthanummethode der ECR frei von Ca^{++} -Ionen gehalten werden kann, wird die Existenz eines intrazellulären Kalziumspeicher- und Transportsystems unterstützt. In dieses könnten während des AP eingeströmte Ca^{++} -Ionen nach oder auch schon vor Aktivierung der kontraktilen Proteine aufgenommen werden. Dagegen spricht aber die Funktionsweise von Verapamil, das als kompetitiver Ca-Antagonist wirkt und Kalzium am Übertritt in die Zelle durch die Membran hindurch hindert (54, 62, 149, 150). Auch läßt die relativ schnelle Austauschbarkeit (Abb. 1) weniger auf eine Membranpassage schließen, als auf ein Speichersystem, das zumindest mit dem ECR in Verbindung stehen muß. Diese Hypothese wurde durch unsere Versuchsergebnisse bestätigt, die eine lineare Abhängigkeit zwischen ausgetauschter Gewebsfraktion und der variablen Kalziumkonzentration im Aufladepad zeigten. Ebenso fanden Grosse und Lüllmann (84) aufgrund photometrischer Bestimmungen eine gut korrelierte lineare Abhängigkeit des Gesamtgewebskalziums von der $[Ca]_e$.

Versuche an "naked" und "coated" Helazellen zeigten, daß die Zelle selbst für die geschilderte Abhängigkeit nicht verantwortlich ist (18). Während die Abhängigkeit von der $[Ca]_e$ bei den "ummantelten Zellen" der von uns gefundenen entsprach, zeigten "nackte" Helazellen eine von der Außenkonzentration unabhängige Kalziumkinetik.

Die membrangebundenen Orte der Ca-Speicherung können durchaus im Bereich der Caveolae liegen, für die von vielen Autoren enge räumliche (36, 38, 67, 68, 134, 144, 157) und funktionelle Beziehungen (82, 141, 142, 155, 174) zu den intrazellulären Kalziumspeichern nachgewiesen wurden. Uns schien es daher notwendig, die durch Lanthanum sequestrierten Sorbiträume mit den Kalziummengen, die mit derselben Methode bestimmt wurden, zu vergleichen. Im Bereich physio-

logischer Kalziumkonzentration in der Badelösung war es auch möglich eine Übereinstimmung beider Räume bzw. Mengen darzustellen. Während in diesem Bereich offensichtlich ein Gleichgewicht zwischen Bindungs- und Diffusionsvorgängen bestehen muß, sind für die Abweichung außerhalb dieses Bereiches sowohl die Schrumpfung des ECR mit steigender Kalziumkonzentration in der Badelösung (28) als auch eine veränderte Sättigungskinetik der zellwandständigen Kalzium - bindungsorte (18) anzunehmen.

Weiterhin sind auch methodische Gründe hierfür verantwortlich, da es wegen des großen Meßbereiches von 0,1 bis 10 mmol/l Ca^{++} nicht möglich war, eine gleichbleibende spezifische Aktivität ($\mu\text{C}/\text{mmol } \text{Ca}^{++}$) aufrecht zu erhalten. Dies hätte eine Überschreitung der zulässigen Grenzen für die verwendeten Aktivitäten bedeutet. Darum haben wir eine gleichbleibende Aktivität/ml der Badelösung gewählt, was dazu führte, daß bei hohen Kalziumkonzentrationen ein relativ geringerer Anteil an markierten 45 Ca^{++} -Ionen zur Verfügung stand.

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch Sorbitaufnahmeversuche von Casteels et al (43), wo unter metabolischer Hemmung des Zellstoffwechsels (mit Sorbit- N_2 bzw. Nitrophenol und Monojodessigsäure) bei Zugabe von 10mmol/l La^{3+} der Sorbitraum bestimmt wurde. Gegenüber der Bestimmung ohne La^{3+} fand sich eine deutlich niedrigere Aufnahmekurve für den gesamten 14 C-Sorbitraum. Obwohl die Differenz in dieser Arbeit nicht bestimmt wurde, läßt sich aus dem Kurvenverlauf entnehmen, daß während der 1. Stunde Aufnahmezeit der Unterschied beider Kurven ca. 30-40 ml/kg FG beträgt.

Dies wäre ein Beweis dafür, daß durch Lanthanum ein Kompartiment sequestriert wird, das mit Stoffwechselvorgängen der Zelle in Verbindung steht.

Allen eigenen und den bereits zitierten Ergebnissen anderer Autoren zufolge, handelt es sich bei diesem Kompartiment in der Größenordnung von 10 % des ECR Volumens um den Bereich der Caveolae, in denen der für die Zelle notwendige Kalziumaustausch via membrangebundene Ca-ATPase durch Bindungs- und Diffusionsvorgänge gesteuert wird.

4.3. Beeinflussung des transmembranalen Kalziumtransportes

Unter der Annahme eines Aktomyosin-Kalziumverhältnisses von 1:1 (87) sind zur vollen Aktivierung des kontraktile Systems am glatten Muskel, wie z.B. während KCl-induzierter Kontraktion ca. 50-60 $\mu\text{mol Ca}^{++}/\text{kg FG}$ erforderlich. Eine alleinige Freisetzung der benötigten Kalziumionen aus intrazellulären Speichern und die dortige Wiederaufnahme ist wegen der Kalziumpermeabilitätsänderung die während des Aktionspotentials auftritt unwahrscheinlich. Wie in der Einleitung gezeigt, ist es zwar rechnerisch auch möglich, daß das gesamte für die Aktivierung der kontraktile Proteine notwendige Kalzium im Laufe von einigen wenigen Aktionspotentialen in die Zelle strömt, jedoch konnte der Nachweis für diese Annahme nie erbracht werden. Auch sprechen unsere Ergebnisse, nach denen sich das aufgenommene Kalzium zum größten Teil im ECR befindet nicht dafür. Als dritte Möglichkeit könnten einige wenige Triggerionen in die Zelle einströmen, was auch unsere Ergebnisse nahelegen. Einerseits spricht hierfür der langsame Verlauf der 45 Ca Aufnahmekurve unter Einwirkung von 30 mmol/l KCl in der Badelösung. Andererseits liegt die gemessene Auspumpleistung bei höchstens 30-40 $\mu\text{mol Ca}^{++}/\text{kg FG}$ während einer Auspumpzeit von 30 min.; dies entspricht Ergebnissen, die bei Effluxversuchen in einer EGTA haltigen Badelösung beschrieben wurden (22). Auch ist es nicht möglich, die schnelle mechanische Antwort, z.B. Kontraktur nach KCl Gabe oder Erschlaffung nach Überführung in Normallösung durch einen direkten transmembranalen Kalziumtransport zu erklären. Während einer KCl Kontraktur müßte bei einer Frequenz von 240-250 Aktionspotentialen pro Minute und einem Kalziumeinstrom von 4 $\mu\text{mol/kg FG/AP}$ (47, 75) das gesamte Kalziumspeichersystem der Zelle innerhalb weniger Minuten überschwemmt sein. Da in unseren Versuchen entsprechend große Effluxmengen nicht gefunden werden konnten, erschien uns auch aus diesem Grunde die Triggertheorie durchaus plausibel.

Zur Kompensierung des passiven Kalziumeinstromes (24) sowie zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgradienten für Kalzium würde eine Ca^{++} -Pumpe ausreichen, die in der von uns gefundenen Größenordnung liegt und den zellulären Kalziumgehalt wie z.B. in Anwesenheit von $5 \times 10^{-5} \text{ mol/l ATP}$ deutlich erniedrigen kann. Bei Anwesenheit von $2,2 \times 10^{-5} \text{ Verapamil}$, d.h. unter Blockierung

der Spontanaktivität resultiert eine Förderleistung, die in etwa der von spontan-aktiven Taenien pro Zeiteinheit aufgenommenen Kalziummengen entspricht. Isoprenalin ($3,5 \times 10^{-6}$) erniedrigt ebenfalls den zellulären Kalziumgehalt, führt aber wahrscheinlich über zyklisches AMP (3, 4, 5, 6) gleichzeitig zur erhöhten intrazellulären Speicherung, was den nicht signifikanten Abfall erklären würde. Dies stimmt auch mit Versuchen überein, bei denen eine Spannungsabnahme der *Taenia coli* unter Isoprenalin ohne Veränderung des Membranpotentials gefunden wurde (32).

Versuche die Kalzium-ATPase "spezifisch" zu hemmen (10^{-4} mol/l RuRot, 10^{-5} mol/l Chlorpromazin) brachten zwar nach erfolgter Aufladung das erwartete Ergebnis einer intrazellulären Kalziumerhöhung, sie erwiesen sich aber auch gleichzeitig als Hemmer des Kalziumseinstromes während des Aufladens. Ihre Wirkung exakt zu differenzieren war uns nicht möglich. Ruthenium-Rot ist nicht in der Lage in die Zelle zu penetrieren (127, 162); es kann jedoch die erschlaffende Wirkung von Isoprenalin (163) sowie die neuromuskuläre Übertragung an der Endplatte (146) kompetitiv hemmen. Bei einer Konzentration von über 50 μ mol/l Ruthenium-Rot geht neben der Kalziumbindungsfähigkeit der Membran auch die gesamte Kalzium-ATPase-Aktivität verloren (128). Der Literatur und den Ergebnissen zufolge werden durch Chlorpromazin und Ruthenium-Rot zellwandnahe Bindungspositionen besetzt und sowohl der Influx von Trigger Kalzium als auch dessen Auswärtstransport behindert.

In Membrannähe lokalisiertes ATP, cAMP und Magnesium (als Cofaktor) haben eine große Bedeutung für den transmembranalen Kalziumtransport (5, 7, 10, 39, 46, 120, 128, 161, 162, 180).

Da wir mit 5×10^{-5} mol/l ATP eine Verringerung des austauschbaren Kalziums gesehen haben, die wir auf eine verstärkte Pumpenaktivität zurückführten, wollten wir das Verhalten dieser Pumpe bei einer Konzentrationserhöhung von ATP darstellen.

Ein Grund hierfür war, daß ATP in der Konzentration von 1 mmol/l als der nicht adrenerge Hemmer postuliert wurde, der im Bereich der *Taenia coli* des Meerschweinchens neben einer Hyperpolarisation zur Einschränkung des inhibitorischen Potential führt (161).

In der von uns verwendeten Hepes- gepufferten bikarbonat- und phosphatfreien Lösung konnten wir durch 1 mmol/l ATP ebenfalls keine Erschlaffung feststellen. Vielmehr spielte sich die mechanische Aktivität auf einem erhöhten Spannungsniveau ab. Dem entsprachen auch die Meßwerte aus den Effluxexperimenten, wo wir unter diesen Bedingungen höhere ausgetauschte Kalziummengen fanden. Erklärbar wäre dies durch eine erhöhte intrazelluläre Speicherung bei vermehrter Kalziumaufnahme in die Zelle. Diese wurde für verschiedene subzelluläre Strukturen unter ATP-Einfluß bereits beschrieben so z.B. für Mikrosomenfraktion der Skelett- und Herzmuskulatur (46) Lebermitochondrien (120), Mitochondrien und Mikrosomen des Rattenmyometriums (10) und der Schweinekoronararterie bzw. des Meerschweinchenileums (180). Quantitative Rückschlüsse auf unsere Ergebnisse sind jedoch nicht möglich, da für die einzelnen Fraktionen bisher sehr unterschiedliche Kalziumspeicherkapazitäten ermittelt wurden.

Neben der bisher beschriebenen Aktivierung intrazellulärer Bindungspositionen könnte die Wirkung von 1 mmol/l ATP auch auf einer Chelatbildung mit zweiwertigen Ionen (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}) beruhen (98). Daß eine ATP Erhöhung nur in Verbindung mit Mn^{++} und Mg^{++} zur maximalen Kalziumspeicherung im SR führt, konnte mit Hilfe von Chlortetracyclin-Fluoreszenzversuchen gezeigt werden (46). Andere Autoren beobachteten, daß die Spannungsentwicklung glycerinisierter Taenien von der Mg^{++} - und ATP Konzentration abhängig ist, jedoch nur bei gleichzeitiger äquimolarer Erhöhung beider Stoffe auftritt (136).

Bei unseren Versuchen könnte eine derartige Chelatbildung von ATP mit Kalzium und Magnesium durchaus mit einer Permeabilitätsänderung und einer Erhöhung der intrazellulären Speicherfähigkeit für Kalzium einhergehen. Als dritte Möglichkeit wäre statt einer Permeabilitätserhöhung auch an eine Substrathemmung der wandständigen Kalzium-ATPase zu denken, die für die ATP Wirkung verantwortlich ist.

Welcher der geschilderten drei Mechanismen im Vordergrund steht, kann unseren Versuchsergebnissen zufolge nicht geklärt werden.

4.4. Koppelung von Erregung und Kontraktion

Bisher wurde sowohl ein reiner transmembranaler Kalziumeinstrom aus dem ECR als auch eine rein intrazelluläre Kalziumfreisetzung als Voraussetzung für die zur Kontraktion nötige myoplasmatische Kalziumkonzentration ausgeschlossen. Nach unseren Ergebnissen muß vor allem die Kalzium-Triggertheorie in Erwägung gezogen werden. Dies würde bedeuten, daß die Membran der glatten Muskelzelle in der Lage ist, auf elektrische Erregungen, unterschwellige Membranpotential-Änderungen oder hormonale Reize einige wenige Kalzium-Ionen durch die Zellwand penetrieren zu lassen und hierdurch eine Freisetzung von Aktivator-Kalzium aus den benachbarten Speicherstrukturen (Mitochondrien, SR, Zellinnenwand) bewirken kann (142). Stellen mit vermutlich hohem Kalzium-Austausch wurden als "close associations" beschrieben (142). Die Nähe der peripheren Mitochondrien zu den mit Vesikeln (Caveolae) besetzten Regionen der Zellmembran ist auffallend (174) und im Gegensatz zu früheren Befunden, wo enge Beziehungen zwischen Mitochondrien und SR nur in oberflächlichen Zellbezirken gesehen wurden (52, 69) sind zahlreiche solche Kontakte zwischen longitudinal angeordnetem SR und den im Bereich der Myofilamente gelegenen Mitochondrien in der Tiefe der Zelle vorhanden (142). Zusätzlich konnten die Autoren zwischen SR und Mitochondrien, SR und Caveolae sowie Mitochondrien und Caveolae neben besonders engen Nachbarschaftsbeziehungen auch einen verstärkten Kalziumaustausch mit Hilfe von Kalzium-Oxalat Präzipitat nachweisen. Quantitative Messungen ergeben, daß ca. 20 % des im SR oder 5 % des in Mitochondrien gespeicherten Kalziums zur vollen Aktivierung des kontraktile Systems ausreichen würden. Obwohl auch die Caveolae nach Popescu et al (142) und unseren Ergebnissen zufolge in der Lage wären, das gesamte für die Aktivierung erforderliche Kalzium zur Verfügung zu stellen, sind sie unserer Meinung nach eher der Ort, der für die Freisetzung einiger Trigger Ionen und wegen seines ATPase Gehaltes für den entgegen dem Konzentrationsgradienten gerichteten Kalziumauswärtstransport in Frage kommt. Diese Theorie wird durch die Ergebnisse der relativ langsam arbeitenden Kalzium-Pumpe quantitativ unterstützt.

Weiterhin sind in der glatten Muskulatur wahrscheinlich auch direkte Verände-

rungen der $[Ca]_i$ durch Überträgerstoffe wie ATP (159), Isoprenalin (32) Histamin (107), Azetylcholin (73) Coffein (13, 91, 137) Norepinephrin und Angiotensin (50) usw. möglich, die direkt das Speichervermögen von Mitochondrien und des SR beeinflussen. Kontrakturen in hypertonen Lösungen (2) dürften auf direkte Veränderung der Caveolae-Struktur zurückzuführen sein (138).

Ein deutlicher Kalziumeinstrom vom ECR in das Zellinnere erfolgt nur bei Depolarisation der Zelle durch KCl. Nach unseren Ergebnissen ist nicht zu erwarten, daß bei einem äquimolaren Austausch von 30 mmol/l KCl gegen NaCl die Caveolaestruktur so beeinflußt wird, daß die gemessenen Kalzium-Erhöhungen ausschließlich extrazellulär zu finden sein sollten.

In diesem Fall der intrazellulären Speicherung war es uns nicht möglich, ein "schnelles" Auspumpen zu verfolgen. Deshalb haben Casteels und van Breemen (41) das Aufladen der Zellen durch Unterkühlung bevorzugt, da hierbei auch die Mitochondrien- und SR-ATPasen-aktivität unterdrückt wird. Die Ergebnisse dieser Autoren liegen jedoch mit 50-60 $\mu\text{mol Ca}^{++}$ /30 Minuten in derselben Größenordnung wie die von uns gemessenen. Aus diesem Grunde sahen wir in dem von uns durchgeführten Verfahren keinen methodischen Fehler. Wir konnten jedoch nicht verifizieren, über welche Strukturen der Kalziumeinstrom bei KCl Depolarisation läuft. Es scheint jedoch, daß hierbei die Permeabilität der nicht mit Caveolae besetzten Membranstellen erhöht wird und das eingeströmte Kalzium nicht den Triggermechanismus auslöst, sondern direkt das kontraktile System aktiviert und anschließend in der Zelle gespeichert wird.

5. Zusammenfassung

5.1. An glatten Muskelzellen der *Taenia coli* wurde die mit der Lanthanummethode bestimmbare Kalziumfraktion untersucht. Im Gegensatz zur bisherigen Meinung einer intrazellulären Lokalisation, haben wir mehrere Hinweise auf ihre vorwiegend extrazelluläre Lage gefunden:

Das Kompartiment steht in ca. 20 Minuten mit dem im ECR vorhandenen freien Kalzium im Gleichgewicht und nimmt in Ruhe ca. $84 \mu\text{mol Ca}^{++}/\text{kg FG}$ auf.

Diese Menge würde, wenn sie intrazellulär aufgenommen wird, zur vollen Aktivierung des kontraktile Systems ausreichen.

Es läßt sich eine im großen und ganzen lineare Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration in der Badelösung feststellen.

Mit der gleichen Methode läßt sich ein Restsorbit-Raum darstellen, der mit 10 % des ECR in der Lage ist, die $84 \mu\text{mol Ca}^{++}/\text{kg FG}$ aufzunehmen. Eine gute Korrelation von Rest ECR und Kalzium-Raum ist im Bereich physiologischer Kalziumkonzentrationen gegeben.

Ähnlich wie der Gesamt-ECR zeigt auch der Restsorbit-Raum eine Schrumpfung mit steigender Kalziumkonzentration.

Die schnelle Beeinflussung dieses Rest ECR durch Lanthanum, Natrium und Hya-luronidase deutete nicht auf intrazelluläre Veränderungen hin.

In den ersten 120 Minuten der Aufladezeit zeigt sich, daß die Membran inaktiver Taenien für Kalzium fast impermeabel ist.

Übereinstimmung in der Größe (10 % des ECR) sowie die vermutlich extrazelluläre Lokalisation machen es wahrscheinlich, daß dieses Kompartiment mit dem Raum der Caveolae intrazelluläres (= Membranvesikel) identisch ist.

5.2. Um den großen Kalziumgradienten zwischen ICR und ECR aufrecht zu erhalten, muß eine spezifische Pumpe bestehen, die Kalzium, das z.B. während der Aktionspotentiale in die Zelle strömt, wieder herausbefördern kann. Nachdem die intrazelluläre Kalziumkonzentration durch KCl-haltige Aufladelösung erhöht worden war, konnte bei gleichbleibender spezifischen Kalziumaktivität in der Badelösung in Gegenwart von Verapamil ($2,2 \times 10^{-5} \text{mol/l}$) und ATP ($5 \times 10^{-5} \text{mol/l}$)

eine signifikante Abnahme der $[Ca]_i$ gesehen werden.

Isoprenalin zeigte einen ähnlichen Effekt, jedoch war die Abnahme wahrscheinlich wegen gleichzeitiger intrazellulärer Speicheraktivierung nicht signifikant.

ATP (10^{-3} mol/l), Chlorpromazin und Ruthenium-Rot konnten zwar den Auswärtstransport hemmen, jedoch wird durch letztere Stoffe auch die intrazelluläre Aufnahme extrazellulären Kalziums gehemmt. Eine Hemmung des nach außen gerichteten Kalziumpumpmechanismus kann unter 10^{-3} mol/l ATP nicht ausgeschlossen werden, jedoch werden für diese ATP Konzentrationen noch andere Funktionsmöglichkeiten diskutiert.

Aus dem langsamen Zeitverlauf des Auspumpens kann geschlossen werden, daß die zur Aktivierung der kontraktilen Proteine notwendige Kalziummenge auf diesem Wege nicht aus der Zelle transportiert werden kann, falls sie durch das AP in die Zelle strömen würde.

5.3. Die AP-abhängige Kontraktion scheint auf der Basis einer im Bereich der Caveolae stattfindenden Freisetzung von Trigger-Kalzium in das Zellinnere zu beruhen. Über die engen Verbindungen zwischen Caveolae und SR bzw. Mitochondrien wird weiteres Kalzium auch in der Tiefe der Zelle freigesetzt (Kontraktion). Mitochondrien und SR haben durch leistungsfähige Kalzium-ATPasen die Möglichkeit, das nicht mehr benötigte Kalzium sofort aufzunehmen (Erschlaffung). Das eingeströmte Trigger-Kalzium wird wahrscheinlich von einer in der Zellmembran lokalisierten Kalzium-ATPase in den ECR zurückgepumpt.

6. Literaturverzeichnis

1. Anderson, N. C., Ramon, F., Snyder, A.: Studies on calcium and sodium in uterine smooth muscle excitation under current-clamp and voltage-clamp conditions. *J. gen. Physiol.* 58, 322-339 (1971).
2. Andersson, C., Hellstrand, P., Johansson, B., Ringberg, A.: Contraction in venous smooth muscle induced by hypertonicity. Calcium dependence and mechanical characteristics. *Acta physiol. scand.*, 90, 451-461 (1974).
3. Andersson, R.: Role of cyclic AMP and Ca^{++} in the metabolic and relaxing effects of catecholamines in intestinal smooth muscle. *Acta physiol. scand.* 85, 312-322 (1972).
4. Andersson, R.: Cyclic AMP and calcium ions in mechanical and metabolic responses of smooth muscles; influence of some hormones and drugs. *Acta physiol. scand.*, suppl. 382 (1972).
5. Andersson, R., Lundholm, L., Mohme-Lundholm, E., Nilsson, K.: Role of cyclic AMP and Ca^{++} in metabolic and mechanical events in smooth muscle. In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, 1, 213-229. Ed. by Greengard et al, Raven Press, New York (1972).
6. Andersson, R., Nilsson, K.: Cyclic AMP and calcium in relaxation in intestinal smooth muscle. *Nature* 238, 119-122 (1972).
7. Bär, H. P.: Cyclic nucleotides and smooth muscle. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 4, 195-237 (1974).
8. Baker, P. F., Blaustein, M. P., Hodgkin, A. L., Steinhardt, R. A.: The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol.* 200, 431-458 (1969).
9. Balzer, H., Makinose, M., Hasselbach, W.: The inhibition of the sarcoplasmic calcium pump by prenylamine, chlorpromazine and imipramine. *Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* 260, 444-455 (1968).
10. Batra, S. C., Daniel, E. E.: Effect of multivalent cations and drugs on calcium uptake by the rat myometrial microsomes. *Comp. Biochem. Physiol.* 38 A 285-300 (1971).
11. Bauer, H., Goodford, P. J., Hüter, J.: The calcium content and 45 calcium uptake of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 176, 163-179 (1965).
12. Berger, W.: Die Doppelsaccharosetrennwandtechnik: Eine Methode zur Untersuchung des Membranpotentials und der Membraneigenschaften glatter Muskelzellen. *Pflügers Arch.* 277, 570-576 (1963).
13. Bittar, E. E., Hift, H., Huddart, H., Tong, E.: The effects of coffee on sodium transport, membrane potential, mechanical tension and ultrastructure in barnacle muscle fibres. *J. Physiol.* 242, 1-34 (1974).
14. Blaustein, M. P.: The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70, 33-82 (1974).
15. Blaustein, M. P., Hodgkin, A. L.: The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J. Physiol.* 200, 497-527 (1969).
16. Bohr, D. F.: Vascular smooth muscle: Dual effect of calcium. *Science* 139, 597-599 (1963).
17. Bohr, D. F.: Vascular smooth muscle updated. *Circ. Res.* 32, 665-672 (1973).
18. Borle, A. B.: Calcium metabolism in Hela cells and the effects of parathyroid hormone. *J. Cell. Biol.* 36, 567-582 (1968).

19. Brading, A., Bülbring, E., Tomita, T.: The effect of sodium and calcium on the action potential of the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 200, 637-654 (1969).
20. Breemen, C. van: Blockade of membrane calcium fluxes by lanthanum in relation to vascular smooth muscle contractility. *Arch.int.Physiol.Biochem.* 77, 710-716 (1969).
21. Breemen, C. van, Breemen, D. van: Stimulation of 45 Ca efflux from smooth muscle by extracellular Ca^{2+} . *Biochim,Biophys.Acta* 163, 114-116 (1968).
22. Breemen, C. van, Casteels, R.: The use of Ca-EGTA in measurements of 45 Ca efflux from smooth muscle. *Pflügers Arch.* 348, 239-245 (1974).
23. Breemen, C. van, Daniel, E. E., Breemen, D. van: Calcium distribution and exchange in the rat uterus. *J.gen.Physiol.* 49, 1265-1298 (1966).
24. Breemen, C. van, Farinas, B. R., Casteels, R., Gerba, P., Wuytack, F., Deth, R.: Factors controlling cytoplasmic Ca^{2+} concentration. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 265, 57-71 (1973).
25. Breemen, C. van, Farinas, B. R., Gerba, P., McNaughton, E. D.: Excitation-contraction coupling in rabbit aorta studied by the Lanthanum method for measuring cellular calcium influx. *Circulat. Res.* 30, 44-54 (1972).
26. Breemen, C. van, McNaughton, E.: The separation of cell membrane calcium transport from extracellular calcium exchange in vascular smooth muscle. *Biochem.biophys.Res. Commun.* 39, 567-574 (1970).
27. Breemen, C. van, de Weer, P.: Lanthanum inhibition of 45 Ca efflux from squid giant axon. *Nature* 226, 760-761 (1970).
28. Breemen, C. van, Wuytack, F., Casteels, R.: Stimulation of 45 Ca efflux from smooth muscle by metabolic inhibition and high K depolarisation. *Pflügers Arch.* 359, 183-196 (1975).
29. Breemen, D. van, Breemen, C. van: Calcium exchange diffusion in a porous phospholipid ion-exchange membrane. *Nature* 223, 898-900 (1969).
30. Bremel, R. D.: Myosin linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle. *Nature* 252, 405-407 (1974).
31. Bülbring, E., Kuriyama, H.: Effects of changes in the external sodium and calcium concentrations on the spontaneous electrical activity in smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 166, 29-58 (1963).
32. Bülbring, E., Kuriyama, H.: The action of catecholamines on guinea-pig taenia coli. *Phil. Trans. R. soc. B.* 265, 115-121 (1973).
33. Bülbring, E., Tomita, T.: The effects of Ba^{2+} and Mn^{2+} on the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 196, 137-139 P (1968).
34. Bülbring, E., Tomita, T.: Increase of membrane conductance by adrenaline in the smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *Proc.R.soc.B.* 172, 89-102 (1969).
35. Bülbring, E., Tomita, T.: Effect of calcium, barium and manganese on the action of adrenaline in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *Proc. R. Soc. B.*, 172, 121-136 (1969).
36. Burnstock, G.: Structure of smooth muscle and its innervation. In: *Smooth Muscle* 1-69, Ed. by E. Bülbring et al. Edw. Arnold Ltd. London (1970).
37. Burton, J., Godfraind, T.: Sodium-calcium sites in smooth muscle and their accessibility to lanthanum. *J. Physiol.* 241, 287-298 (1974).

38. Caesar, R., Edwards, G. A., Ruska, H.: Architecture and nerve supply of mammalian smooth muscle tissue. *J. biophys. biochem. Cytol.* 3, 867-889 (1957).
39. Carsten, M. E.: Hormonal regulation of myometrial calcium transport. *Gynecol. Invest.* 5, 269-275 (1974).
40. Casteels, R.: The relation between membrane potential and the ion distribution in smooth muscle cells. In: *Smooth Muscle*, 70-99, Ed. by E. Bülbbring et al. Edw. Arnold Ltd. London (1970).
41. Casteels, R., van Breemen, C.: Active and passive Ca^{2+} fluxes across cell membranes of the guinea-pig taenia coli. *Pflügers Arch.* 359, 197-207 (1975).
42. Casteels, R., van Breemen, C., Mayer, C. J.: A study of the calcium distribution in smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli using La^{3+} . *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* 199, 193-194 (1972).
43. Casteels, R., van Breemen, C., Wuytack, F.: Effect of metabolic depletion on the membrane permeability of smooth muscle cells and its modification by La^{3+} . *Nature New Biology* 239, 249-251 (1972).
44. Casteels, R., Goffin, J., Raeymaekers, L., Wuytack, F.: Calcium pumping in the smooth muscle cells of the taenia coli. *J. Physiol.* 231, 19-20 (1973).
45. Casteels, R., Raeymaekers, L., Wuytack, F.: Metabolism of smooth muscle cells under aerobic and anaerobic conditions. *J. Physiol.* 232, 27-29 (1973).
46. Caswell, A. H., Warren, S.: Observation of calcium uptake by isolated sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res.* 46, 1757-1763 (1972).
47. Collins, G. A., Sutter, M. C., Teiser, J. C.: Calcium and contraction in the rabbit anterior mesenteric-portal vein. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 50, 289-299 (1972).
48. Csapo, A.: Smooth muscle as a contractile unit. *Physiol. Rev.* 42, 7-33 (1962).
49. Daniel, E. E.: Attempted synthesis of data regarding divalent ions in muscle function. In: *Muscle* 295-313 Ed. by W. M. Paul et al. Pergamon Press, New York (1965).
50. Deth, R., van Breemen, C.: Relative contributions of Ca^{2+} influx and cellular Ca^{2+} release during drug induced activation of the rabbit aorta. *Pflügers Arch.* 348, 13-22 (1974).
51. Devine, C. E., Somlyo, A. P.: Ultrastructure of vascular smooth muscle (VSM) studied with lanthanum. *Fed. Proc. R. Soc. B.* 29, 455 (1970).
52. Devine, C. E., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P.: Sarcoplasmic reticulum and excitation coupling in mammalian smooth muscles. *J. Cell. Biol.* 52, 690-718 (1972).
53. Devine, C. E., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P.: Sarcoplasmic reticulum and mitochondria as cation accumulating sites in the smooth muscle. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 265, 17-23 (1973).
54. Dörfler, F.: Untersuchungen zur Abhängigkeit verschiedener Aktivierungsmechanismen glatter Muskulatur (Taenia coli des Meerschweinchens) von der extrazellulären Kalzium-Konzentration und vom Kalzium-Antagonisten Iproveratril. Inaugural Dissertation. München (1974).
55. Ebashi, S.: Calcium ions and muscle contraction. *Nature* 240, 217-218 (1972).
56. Ebashi, S., Endo, M.: Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 18, 123-183 (1968).

57. Endo, M., Tanaka, M., Ogawa, Y.: Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*, 228, 34-36 (1970).
58. Fabiato, A., Fabiato F.: Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibres with disrupted or closed sarcolemmas *Circulat. Res.* 31, 293-307 (1972).
59. Filo, R. S., Bohr, D. F., Ruegg, J. C.: Glycerinated skeletal and smooth muscle. *Science* 147, 1581-1583, (1965)
60. Fitzpatrick, D. F., Landon, E. J., Debbas, G., Hurwitz, L.: A calcium pump in vascular smooth muscle. *Science*, 176, 305-306 (1972).
61. Fleckenstein, A., Tritthart, H., Fleckenstein B., Herbst, A., Gruen, G.: Selektive Hemmung der Myocard-Contractilität durch competitive Ca^{++} - Antagonisten (Iproveratril, D 600, Prenylamin). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak.* 264, 227-228 (1969).
62. Fleckenstein, A., Grün, G., Tritthart, H., Byon, K.: Uterus Relaxation durch hochaktive Ca^{++} -antagonistische Hemmstoffe der elektro-mechanischen Koppelung wie Isoptin (Verapamil, Iproveratril), Substanz D 600 und Segontin (Prenylamin). *Klin. Wschr.* 49, 32-41, (1971)
63. Ford, L. E., Podolsky, R. J.: Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA buffered solutions. *J. Physiol.* 223, 1-19 (1972).
64. Ford, L. E., Podolsky, R. J.: Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres. *J. Physiol.* 223, 21-33 (1972).
65. Freeman, D. J., Daniel, E. E.: Calcium movements in vascular smooth muscle and its detection using lanthanum as a tool. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 51, 900-913 (1973)
66. Gabella, G.: Relationship between sarcoplasmic reticulum and caveolae intracellulares in intestinal smooth muscle. *J. Physiol.* 216, 42-43 (1971).
67. Gabella, G.: Caveolae intracellulares and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *J. Cell. Sci.* 8, 601-609 (1971).
68. Gabella, G.: The arrangement of sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Experientia*, 28, 948-949 (1972).
69. Gabella, G.: Fine structure of smooth muscle. *Phil. Trans. R. soc. B* 265, 7-16 (1973).
70. Golenhofen, K., Lammel, E.: Selective suppression of some components of spontaneous activity in various types of smooth muscle by iproveratril (verapamil). *Pflügers Arch.* 331, 233-243 (1972).
71. Golenhofen, K., Hermstein, N., Lammel, E.: Membrane potential and contraction of vascular smooth muscle (portal vein) during application of noradrenaline and high potassium, and selective inhibitory effects of iproveratril (verapamil). *Microvasc. Res.* 5, 73-80 (1973).
72. Golenhofen, K., Wegener, H.: Tonische, spike-freie Aktivierungsmechanismen bei der Magenmuskulatur des Meerschweinchens. *Pflügers Arch.* 335, Suppl. 255 (1972).
73. Golenhofen, K., Wegener, H.: Spike-free activation mechanism in smooth muscle of guinea-pig stomach. *Pflügers Arch.* 354, 29-37 (1975).
74. Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Conolly, T. N., Izawa, S., Singh, R. M. M.: Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5, 467-477 (1966).
75. Goodford, P. J.: The loss of radioactive 45 calcium from the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 176, 180-190 (1965).

76. Goodford, P. J.: An interaction between potassium and sodium in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 186, 11-26 (1966)
77. Goodford, P. J.: The calcium content of the smooth muscle of the guinea pig taenia coli. *J. Physiol.* 192, 145-157 (1967).
78. Goodford, P. J.: Ionic interactions in smooth muscle. In: *Smooth Muscle* 100-121, Ed. by E. Bülbring et al. Edw. Arnold Ltd., London (1970).
79. Goodford, P. J., Hermansen, K.: Sodium and potassium movements in the unstriated muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 158, 426-448 (1961).
80. Goodford, P. J., Leach, E. H.: The extracellular space of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 186, 1-10 (1966).
81. Goodford, P. J., Lüllmann, H.: The uptake of ethanesulphonate 35 S-ions by muscular tissue. *J. Physiol.* 161, 54-61 (1962).
82. Goodford, P. J., Wolowyk, M. W.: Localization of cation interactions in the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 224, 521-535 (1972).
83. Goodman, F. R., Weiss, G. B.: Contractile responses and 45 Ca movements in monkey ileal smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 209, 14-25 (1974).
84. Grosse, D., Lüllmann, H.: Tissue Ca content of intestinal smooth muscles and the Ca^{++} -concentration of the incubation medium. *Experientia* 28 412-413 (1972).
85. Hagiwara, S., Naka, K. I.: The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca^{++} . *J. gen. Physiol.* 48, 141-162 (1965).
86. Hamoir, G.: Extractability and properties of the contractile proteins of vertebrate smooth muscle. *Phil. Tran. R. Soc. B.* 265, 169-181 (1973).
87. Hasselbach, W.: Kapitel: Muskel. In: *Physiologie des Menschen*, Ed. by Gauer, Kramer, Jung. Urban & Schwarzenberg-Verlag, München-Berlin-Wien (1971).
88. Hodgson, B.: Association between ion movements, electrical events and the actions of drugs on the isolated rat myometrium. Ph. D. Thesis, University of Alberta, Edmonton, Alberta (1971).
89. Hodgson, B. J., Kidwai, A. M., Daniel, E. E.: Uptake of Lanthanum by smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 50, 730-733 (1972).
90. Hotta, Y., Tsukui, R.: Effect on the guinea-pig taenia coli of the substitution of strontium or barium ions for calcium ions. *Nature* 217, 867-869 (1968)
91. Huddart, H., Syson, A. J.: The effect of caffeine on calcium efflux and calcium translocation in skeletal and visceral muscle. *J. exp. Biol.* 63, 131-142 (1975).
92. Hurwitz, L.: Some characteristics of the excitation-contraction coupling process in smooth muscle. In: *Concepts of Membranes in Regulation and Excitation* 55-72 Ed. by M. Rocha e Silva and G. Suarez-Kurtz, Raven Press, New York (1975).
93. Hurwitz, L., Fitzpatrick, D. F., Debbas, G., Landon, E. J.: Localization of calcium pump activity in smooth muscle. *Science* 179, 384-386 (1973).
94. Hurwitz, L., v. Hagen, S., Joiner, P. D.: Acetylcholine and calcium on membrane permeability and contraction of intestinal smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 50, 1157-1172 (1967).
95. Hurwitz, L., Joiner, P. D.: Mobilization of cellular calcium for contraction in intestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 218, 12-19 (1970).

96. Hurwitz, L., Suria, A.: The link between agonist action and response in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol.* 11, 303-326 (1971).
97. Jonas, L., Zelck, U.: The subcellular calcium distribution in the smooth muscle cells of the pig coronary artery. *Exptl. Cell. Res.* 89, 352-358 (1974).
98. Kahn, M. M. T., Martell, A. E.: Metal chelates of adenosine triphosphate. *J. Phys. Chem.* 66, 10-15 (1962).
99. Kao, C. Y.: Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* 18, 997-1049 (1966).
100. Kao, C. Y., Mc Cullough, J. R.: Ionic currents in the uterine smooth muscle. *J. Physiol.* 246, 1-36 (1975).
101. Karaki, H., Urakawa, N.: A shift of cellular calcium to a more slowly exchangeable fraction during contraction in guinea pig taenia coli. *Jap. J. Pharmacol.* 22, 511-518 (1972).
102. Katase, T.: Effects of bicarbonate removal on the spontaneous mechanical activity of the guinea pig uterus. *Jap. J. Physiol.* 24, 451-461 (1974).
103. Katase, T., Tomita, T.: Influences of sodium and calcium on the recovery process from potassium contracture in the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 224, 489-500 (1972).
104. Katz, S., Blostein, R.: Ca^{2+} stimulated membrane phosphorylation and ATPase activity of the human erythrocyte. *Biochim. Biophys. Acta* 389, 314-324 (1975).
105. Kaufmann R., Fleckenstein A.: Die Bedeutung der Aktionspotentialdauer und der Ca^{++} -Ionen beim Zustandekommen der positiv-inotropen Kältewirkungen am Warmblüter-Myokard. *Pflügers Arch.* 285, 1-18 (1965).
106. Kerrick, W. G. L., Best, P. M.: Calcium ion release in mechanically disrupted heart cells. *Science* 183, 435-437 (1974).
107. Kirkpatrick, C. T.: Excitation and contraction in bovine tracheal smooth muscle. *J. Physiol.* 244, 263-281. (1975).
108. Kohlhardt, M., Bauer, B., Krause, H., Fleckenstein, A.: Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors. *Pflügers Arch.* 335, 309-322 (1972).
109. Kohlhardt, M., Haastert, H. P., Krause, H.: Evidence of non-specificity of the Ca channel in mammalian myocardial fibre membranes. *Pflügers Arch.* 342, 125-136 (1973).
110. Kohlhardt, M., Herdey, A., Kübler, M.: Interchangeability of Ca ions and Sr ions as charge carriers of the slow inward current in mammalian myocardial fibres. *Pflügers Arch.* 344, 149-158 (1973).
111. Koketsu, K., Nishi, S.: Calcium and action potentials of bullfrog sympathetic ganglion cells. *J. gen. Physiol.* 53, 608-623 (1969).
112. Kumamoto, M., Horn, L.: Voltage clamping of smooth muscle from taenia coli. *Microvasc. Res.* 2, 188-201 (1970).
113. Kuriyama, H.: Effects of ions and drugs on the electrical activity of smooth muscle. In: *Smooth Muscle* 366-395, Ed. by E. Bülbiring et al. Edw. Arnold Ltd. London (1970).
114. Kuriyama, H., Osa, T., Toida, N.: Effects of tetrodotoxin on smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Brit. J. Pharmacol.* 27, 366-376 (1966).
115. Kuriyama, H., Tomita, T.: The responses of single smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli to intracellularly applied currents, and their effects on the spontaneous electrical activity. *J. Physiol.* 178, 270-289 (1965).

116. Lammel, E., Golenhofen, K.: Erregbarkeit und Ca-Austausch intestinaler glatter Muskulatur (Taenia coli des Meerschweinchens) unterhalb der kritischen Temperatur für die Spontanaktivität. *Pflügers Arch.* 329, 258-268 (1971).
117. Lammel, E., Golenhofen, K.: Messungen der ^{45}Ca -Aufnahme an intestinaler glatter Muskulatur zur Hypothese eines von Ca-Ionen getragenen Aktionsstromes, *Pflügers Arch.* 329, 269-282 (1971).
118. Langer, G. A.: Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility. *Physiol. Rev.* 48, 708-757 (1968).
119. Laszlo, D., Eckstein, D. M., Lewin, R., Stern, K. G.: Biological studies on stable and radioactive rare earth compounds. I. On the distribution of lanthanum in the mammalian organism. *J. Nat. Cancer Inst.* 13, 559-571 (1952).
120. Lehninger, A. L.: Ca^{2+} transport by mitochondria and its possible role in the cardiac contraction-relaxation cycle. *Circ. Res., Suppl. III* 34, 83-90 (1974).
121. Lettvin, J. Y., Pickard, W. E., McCulloch, W. J.: A theory of passive ion flux through axon membranes. *Nature*, 202, 1338-1339 (1964).
122. Löwe, H.: (Ergänzung zu Löwe et al 1974), pers. Mitteilung an C. J. Mayer (1975).
123. Löwe, H., Grunewald, I., Grochalski, G.: Änderung der Ultrastruktur glatter Muskelzellen der Tunica muscularis des Meerschweinchenileums durch Funktionsbeeinflussung in vitro. *Acta biol. med. germ.* 32, 219-233 (1974).
124. Loh, D. von, Golenhofen, K.: Temperatureinflüsse auf die Spontanaktivität der isolierten Taenia coli vom Meerschweinchen. *Pflügers Arch.* 318, 35-50. (1970).
125. Lüllmann, H.: Calcium fluxes and calcium distribution in smooth muscle. In: *Smooth Muscle*. 151-165, Ed. by E. Bülbirg et al, Edw. Arnold Ltd. London (1970).
126. Lüllmann, H., Mohs, P.: The calcium metabolism of intestinal smooth muscle during forced electrical stimulation. *Pflügers Arch.* 308, 214-224 (1969).
127. Luft, H. J.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods for use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171, 347-368 (1971).
128. Madeira, M. C., Antunes-Madeira, M. C.: Interaction of ruthenium red with isolated sarcolemma. *J. Membrane Biol.* 17, 41-50 (1974).
129. Marshall, J. M., Kroeger, E. A.: Adrenergic influences on uterine smooth muscle. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 265, 135-148 (1973).
130. Mayer, C. J., van Breemen, C., Casteels, R.: The action of lanthanum and D 600 on the calcium exchange in the smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli. *Pflügers Arch.* 337, 333-350 (1972).
131. Mironneau, J.: Excitation-contraction coupling in voltage clamped uterine smooth muscle. *J. Physiol.* 233, 127-141 (1973).
132. Mironneau, J.: Voltage clamp analysis of the ionic currents in uterine smooth muscle using the double sucrose gap method. *Pflügers Arch.* 352, 197-210 (1974).

133. Moore, C. L. : Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 298-305 (1971).
134. Nagasawa, J., Suzuki, T. : Electron microscopic study on the cellular inter-relationships in the smooth muscle. *Tohoku J. exp. Med.* 91, 299-313 (1967).
135. Nakamura, Y., Nakajima, S., Grundfest, H. : The action of tetrodotoxin on electrogenic components of squid giant axons. *J. gen. Physiol.* 48, 985-996 (1965).
136. Nasu, T., Ishida, Y. : Interaction of Ca, Mg and ATP in glycerinated taenia coli of guinea pig. *Jap. J. Pharmacol.* 25, 535-540 (1975).
137. Nasu, T., Urakawa, N. : Effect of caffeine on contractile activity and calcium movement in guinea pig taenia coli. *Jap. J. Pharmacol.* 24, 543-550 (1974).
138. Nishihara, H. : Some observations on fine structure of guinea-pig taenia coli after incubation in hypertonic solution. *J. Anat.* 107, 101-114 (1970).
139. Nonomura, Y., Hotta, Y., Ohashi, H. : Tetrodotoxin and manganese ions; Effects on electrical activity and tension in taenia coli of guinea-pig. *Science* 152, 97-99 (1966).
140. Parry, D. J., Kover, A., Frank, G. B. : The effect of lanthanum on excitation-contraction-coupling in frog skeletal muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 52, 1126-1135 (1974).
141. Popescu, L. M. : A conceptual model of the excitation-contraction coupling in smooth muscle: the possible role of the surface microvesicles. *Studia Biophys.* 44, 141-153 (1974).
142. Popescu, L. M., Diculescu, I., Zelck, U., Ionescu, N. : Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. *Cell Tiss. Res.* 154, 357-378 (1974).
143. Popescu, L. M., Dumitrescu, I., Ionescu, N. : The subcellular localization of calcium in vertebrate smooth muscle. In: *Histochemistry and cytochemistry* p.267; Ed. by T. Takeuchi et al., Nakanishi Printing Co. Kyoto (1972).
144. Prosser, C. L., Burnstock, G., Kahn, J. : Conduction in smooth muscle: comparative structural properties. *Am. J. Physiol.* 199, 545-552 (1960).
145. Raeymaekers, L., Wuytack, F., Casteels, R. : Na-Ca exchange in taenia coli of the guinea-pig. *Pflügers Arch.* 347, 329-340 (1974).
146. Rahamimoff, R., Alnaes, E. : Inhibitory action of ruthenium red on neuromuscular transmission. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3613-3616 (1973).
147. Reuter, H., Blaustein, M. P., Haeusler, G. : Na-Ca exchange and tension development in arterial smooth muscle. *Phil. Trans. R. soc. B* 265, 87-94 (1973).
148. Rhodes, H. J., Sutter, M. C. : The action of diazoxide on isolated vascular smooth muscle of the guinea-pig portal vein in isotonic and hypertonic solutions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 49, 276-287 (1971).
149. Riemer, J., Dörfler, F., Mayer, C. J., Ulbrecht, G. : Calcium-antagonistic effects on the spontaneous activity of guinea pig taenia coli. *Pflügers Arch.* 351, 241-258 (1974).
150. Riemer, J., Mayer, C. J., Ulbrecht, G. : Competitive antagonizable effects of calcium on the isolated taenia coli of guinea-pig. *Pflügers Arch.* 332, R 151 (1972).

151. Rougier, O., Vassort, G., Garnier, D., Gargouil, Y. M., Coraboeuf, E.: Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflügers Arch.* 308, 91-110 (1969).
152. Rüegg, J. C.: Smooth muscle tone. *Physiol. Rev.* 51, 201-248 (1971).
153. Russell, J. M., Blaustein, M. P.: Calcium efflux from barnacle muscle fibers; dependence on external cations. *J. gen. Physiol.* 63, 144-167 (1974).
154. Schatzmann, H. J.: Correlations between $(Na + K) - ATPase$, $Ca - ATPase$, $Ca - ATPase$ and cellular potassium concentration in cattle red cells. *Nature* 248, 58-60 (1974).
155. Somlyo, A. P., Devine, C. E., Somlyo, A. V.: Sarcoplasmic reticulum, mitochondria and filament organisation in vascular smooth muscle. In: *Vascular smooth muscle, a symposium*. 119-121, Ed. by E. Betz, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1972).
156. Somlyo, A. P., Devine, C. E., Somlyo, A. V., North, S. R.: Sarcoplasmic reticulum and temperature-dependent contraction of smooth muscle in calcium-free solutions. *J. Cell. Biol.* 51, 722-741 (1971).
157. Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Devine, C. E., Peters, P. D., Hall, T. A.: Electron microscopy and electron probe analysis of mitochondrial cation accumulation in smooth muscle. *J. Cell. Biol.* 61, 723-742 (1974).
158. Takata, M., Pickard, W. F., Lettvin, J. Y., Moore, J. W.: Ionic conductance changes in lobster axon membrane when lanthanum is substituted for calcium. *J. Gen. Physiol.* 50, 461-471 (1966).
159. Tomita, T.: Electrical properties of mammalian smooth muscle. In: *Smooth Muscle 197-243*. Ed. by E. Bülbring et al, Edw. Arnold Ltd. London (1970).
160. Tomita, T., Watanabe, H.: Factors controlling myogenic activity in smooth muscle. *Phil. Trans. R. soc. B.* 265, 73-85 (1973).
161. Tomita, T., Watanabe, H.: A comparison of the effects of adenosine triphosphate with noradrenaline and with the inhibitory potential of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 231, 167-177 (1973).
162. Tomiyama, A., Takayanagi, I., Takagi, K.: Relationships between Ca^{2+} uptake by a microsomal fraction of guinea-pig taenia caecum and its relaxation. *Biochem. Pharmacol.* 24, 9-12 (1975).
163. Tomiyama, A., Takayanagi, I., Saeki, M., Takagi, K.: Beta-adrenergic blocking action of ruthenium red. *Jap. J. Pharmac.* 23, 889-890 (1973).
164. Trautwein, W., McDonald, T. F., Tripathi, O.: Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. *Pflügers Arch.* 354, 55-74 (1975).
165. Tritthart, H., Kaufmann, R., Volkmer, H. P., Bayer, R., Krause H.: Calcium movement controlling myocardial contractility. *Pflügers Arch.* 338, 207-231 (1973).
166. Urakawa, N., Holland, W. C.: Ca^{45} uptake and tissue calcium in K-induced phasic and tonic contraction in taenia coli. *Am. J. Physiol.* 207 (4), 873-876 (1964).
167. Vale, M. G. P., Carvalho, A. P.: Effects of ruthenium red on Ca^{2+} uptake and $ATPase$ of sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 325, 29-37 (1973).

168. Vasington, F.D., Gazotti, P., Tiozzo, R., Carafoli, E.: The effect of ruthenium red on Ca^{2+} transport and respiration in rat Liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 256, 43-54 (1972).
169. Vassort, G.: Initial ionic currents in guinea-pig myometrium. *J. Physiol.* 237, 50-51 (1974).
170. Watson, E.L., Vincenzi, F.F., Cavis, P.W.: Ca^{2+} -activated membrane ATPase: selective inhibition by ruthenium red. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 606-610 (1971).
171. Wienbeck, M., Golenhofen, K., Lammel, E.: The effects of CO_2 and pH on the spontaneous activity of the taenia coli of guinea-pig, *Pflügers Arch.* 334, 181-192 (1972).
172. Weiss, G.B.: Cellular pharmacology of lanthanum. *Ann. Rev. Pharmacol.* 14, 343-354 (1974).
173. Weiss, G.B., Goodman, F.R.: Effect of lanthanum on contraction, calcium distribution and 45 Ca movements in intestinal smooth muscle. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 169, 46-55 (1969).
174. Wootton, G.S., Goodford, P.J.: An association between mitochondria and vesicles in smooth muscle. *Cell. Tiss. Res.*, 161, 119-132 (1975).
175. Worsfold, M., Peter, J.B.: Kinetics of calcium transport by fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. biol. Chem.* 245, 5545-5552 (1970).
176. Wuytack, F., Casteels, R.: The energy-rich phosphates in smooth muscle of the guinea-pig taenia coli during metabolic depletion. *Arch. int. Physiol. Biochim.* 80 (4), 829-830 (1972).
177. Yamabe, S., Suzuki, A., Matsumoto, H.: Inhibition of K-induced tonic contraction in vas deferens of guinea pig by chlorpromazine and its free radical. *Jap. J. Pharmacol.* 24, 135-140 (1974).
178. Yamauchi, A.: Electron microscopic studies on the autonomic neuromuscular junction in the taenia coli of the guinea-pig. *Acta anat. Nippon.* 39, 22-38 (1964).
179. Zelck, U., Jonas, L., Wieggershausen, B.: Ultrahistochemischer Nachweis von Calcium in glatten Muskelzellen der Arteria coronaria sinistra des Schweins. *Acta histochem.* 44, 180-182 (1972).
180. Zelck, U., Karnstedt, U., Albrecht, E.: Calcium uptake and calcium release by subcellular fractions of smooth muscle. *Acta biol. med. germ.* 34, 981-986 (1975).

7. Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Priv. Doz. Dr. C. J. Mayer und seinen Mitarbeitern danke ich für die Betreuung und Anleitung bei der Durchführung meiner Arbeiten.

Insbesondere danke ich meiner Frau für die stete Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.



8. Lebenslauf

Name: Ölscher, Josef Wolfgang
 Geb.Ort: Kötzing
 Geb.Dat.: 13. Okt. 1947
 Konfession: röm.kath.
 Staatsangehörigk.: deutsch
 Eltern: Bruno Ölscher, Volksschullehrer
 Frieda, geb. Rapp, Hausfrau
 Geschwister: 1 Schwester, 1 Bruder
 Beruf: Arzt
 Schulbildung: Volksschule Asbach und Reutern (Ndb.)
 Adalbert-Stifter Gymnasium (frühere Oberrealschule
 Passau)
 Abitur: Juni 1969
 Bundeswehr: Einstellung 7.7.1969 als Sanitätsoffizier-Anwärter
 in München. Dort Grundausbildung und Offizierlehrgänge
 Studium: SS 1970 Studienbeginn an der Mediz. Fakultät der
 Ludwig-Maximilians-Universität München.
 WS 70/71 Naturwissenschaftl. Vorprüfung,
 SS 72 Ärztliche Vorprüfung, Dez. 1975 Ärztliche
 Prüfung; anschließend 1 Jahr Medizinalassistenten-
 zeit im BWKrankenhaus München
 Ärztliche Tätigkeit: Dez. 1976 Truppenarzt in Fürstenfeldbruck; Nov. 1977
 Einsatz als Fliegerarzt beim Jagdbombergeschwader 49
 Jan. 1969 Erwerb der arbeitsmedizinischen Fachkunde.
 Seither als Fliegerarzt und Betriebsarzt tätig.

